

Thermodynamik und Kinetik
der kooperativen Tripelhelix-Knäuel-Umwandlung
bei kurzen Peptiden
mit kollagenähnlicher Sequenz

Hermann Weidner

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Thermodynamik und Kinetik der kooperativen
Tripelhelix-Knäuel-Umwandlung bei kurzen Peptiden mit
kollagenähnlicher Sequenz

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Fakultät für Chemie und Pharmazie der
Ludwig-Maximilians-Universität
München



vorgelegt von
Hermann Weidner

München 1973



1. Berichterstatter: Prof. Dr. J. Engel
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G.-M. Schwab

Tag der Einreichung der Arbeit: 19. 9. 1973
Tag der Annahme der Arbeit: 5. 11. 1973
Tag der mündlichen Prüfung: 27. 11. 1973

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von August 1969 bis August 1973 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Jürgen Engel und Herrn Prof. Dr. Georg-Maria Schwab im Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München, und am Biozentrum der Universität Basel.

Herrn Prof. Dr. J. Engel danke ich herzlich für die Unterstützung der Arbeit und für zahlreiche anregende Diskussionen, Herrn Prof. Dr. G.-M. Schwab für sein wohlwollendes Interesse.

Herrn Dr. P. Fietzek aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Kühn (Biochemisches Zentrum der Max-Planck-Gesellschaft, München) danke ich für die Bereitstellung des Kollagenfragments CB2.

Herrn Prof. Dr. R. Huber (Biochemisches Zentrum) bin ich für die Bereitstellung von Rechenzeit an der IBM 360 und der Siemens 4004 zu Dank verpflichtet, wo ich den numerischen Vergleich von Theorie und Experiment (Kapitel VII.C.1.b) durchführte. Das Universitätsrechenzentrum Basel stellte freundlicher Weise die zur Kettensimulation (Kapitel VI.C) erforderliche Rechenzeit an der Univac 1108 (Firma Sandoz, Basel) zur Verfügung.

INHALTSVERZEICHNIS

	S.
Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole	v
I. Einleitung	1
II. Struktur und Stabilität der Tripelhelix	3
III. Übersicht über die Theorien für kooperative Umwandlungen bei linearen Polymeren	6
A. Theorien zum thermodynamischen Gleichgewicht	6
1. Matrixmethode	7
2. Kombinatorische Methoden bei mehrsträngigen Helices	10
B. Theorien zur Umwandlungskinetik	13
1. Relaxationskinetik	13
2. Steady-State-Kinetik bei Oligomeren	16
IV. Grundlegende Reaktionen dritter Ordnung	19
A. Das Alles-Oder-Nichts-Modell (AON)	21
1. Thermodynamik	21
2. Relaxationskinetik im AON-Modell	24
B. Zweistufen-Modelle	26
1. Ausbildung einer Dimeren-Zwischenstufe	26
a. Reaktion 3. Ordnung bei vorgelagertem schnellen Gleichgewicht zwischen A_2 und A	28
b. Schnelles Gleichgewicht zwischen A_2 und B	30
2. Existenz einer trimeren Zwischenstufe	31

IV.	S.
C. Steady-State-Reaktionen bei langsamer Keimbildung in einem Reaktionsschritt 3. Ordnung	33
1. Einfache Reaktionskette	33
2. Berücksichtigung verschiedener statistischer Gewichte der Reaktanden	35
V. Zum Sternschema erweitertes Reaktionsmodell	38
A. Modell und Voraussetzungen	38
1. Reaktionsmechanismus	38
2. Annahmen zum Meßsignal	40
B. Thermodynamik der "Staggering-Zipper"-Modelle	43
1. Der "AON-Stern"	43
2. Der "mehrstufige Stern"	48
3. Bestimmung von Reaktionsenthalpien aus den Umwandlungskurven	51
C. Relaxationskinetik bei gleicher Nukleationsgeschwindigkeit in allen Strahlen ("einstufiger AON-Stern")	53
1. Mittlere Relaxationszeit	54
2. Sämtliche Relaxationszeiten	59
3. Verhalten bei nicht-infinitesimalen Gleichgewichtsänderungen	65
D. Relaxationskinetik bei unterschiedlichen Bildungsgeschwindigkeiten der einzelnen Spezies: $\vec{k}_r = \vec{k}_r(r)$	69
1. Die Reaktionsgeschwindigkeit k_r hängt nur von Potenzen von r ab: $\vec{k}_r = k_n \cdot r^x$	69
2. Zusammensetzung der Kinetik aus Steady-State-Reaktionen: "einfacher" und "allgemeiner Steady-State-Stern"	70

	S.
VI. Ein statistisches Modell zur Nukleation	75
A. Das Modell von Propagation und Nukleation	75
B. Anteil σ_T : Begegnung der Segmente	77
C. Statistische Simulation der nukleationsbedingten Einschränkungen sterischer Anordnungen	79
D. Gesamtbilanz der Nukleation	83
VII. Messungen am Peptid CB2 aus der $\alpha 1$ -Kette des Kollagens	85
A. Peptid und Lösungsmittel	85
1. Das Kollagenfragment $\alpha 1$ -CB2	85
2. Citratpuffer und Peptidkonzentration	86
B. Meßverfahren	86
1. Messung der optischen Aktivität zur Bestimmung des Umwandlungsgrades	86
2. "Poor Man's T-Jump" zur Beobachtung der Reaktionskinetik	87
3. Untersuchungen mit der analytischen Ultrazentrifuge	89
C. Auswertung und Vergleich mit den theoretischen Ergebnissen	90
1. Umwandlungskurven	90
a. Normierung auf $[\alpha]^A - [\alpha]^C$	90
b. Numerische Anpassung der Parameter an die Messungen	92

VII.	S.
C.2. Kinetik	98
a. Reaktionsordnung	98
b. Relaxationskinetik im Vergleich zum Sternschema	99
D. Diskussion der Resultate	104
VIII. Zusammenfassung	110
IX. Literaturverzeichnis	113

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

Die Gleichungen sind für jedes Kapitel fortlaufend nummeriert. Hinweise auf Gleichungen desselben Kapitels erfolgen ohne Angabe der Kapitelnummer.

Abkürzungen:

Die Aminosäuren sind wie üblich abgekürzt:
Ala(nin), Arg(inin), Glu(taminsäure), Gly(cin),
H(omo)se(rin), Hy(droxy)P(rolin), Leu(cin),
Phe(nylalanin), Pro(lin), Ser(in).

AON "Alles-Oder-Nichts"

Zeichen:

Vektorrechnung:

Vektoren: einfach unterstrichene Kleinbuchstaben

Matrizen: doppelt unterstrichene Großbuchstaben

inverse Matrix: Potenz -1

transponierte Matrix: hochgestelltes t

ln Logarithmus zur Basis e

log Logarithmus zur Basis 10

:= "definiert durch"

Zeichengebung bei der Betrachtung von Differenzen:

Δ : Änderung beim Formelumsatz in Molen; dabei werden thermodynamische Größen bei Aufnahme durch das System (Reaktion von links nach rechts) positiv gezählt.

δ : Änderungen auf Grund der vorgenommenen Gleichgewichtsstörung. Der alte Gleichgewichtszustand wird durch "o" bezeichnet, der neue durch einen Querstrich, z.B. $\delta y = \bar{y} - y$

Die Ableitung nach der Zeit wird oft durch einen Punkt gekennzeichnet: $\dot{\epsilon}$

lateinische Buchstaben:

A	Monomer (in Knäuelform)
A_2, A_3	Dimer und Trimer ohne Aussage zur Struktur
AE	Aktivierungsenergie
B	Tripelhelix
B_r	Tripelhelix mit r Wasserstoffbrücken
C	Coil(=Knäuel)-Konfiguration
c	Gesamtkonzentration an Monomeren (in Mol/l)
c_{index}	molare Konzentration der bezeichneten Spezies
c'	Konzentration in g/100 ml
<u>E</u>	Einheitsmatrix
F	Freie Energie
f_r	statistisches Gewicht des Zustandes r im mehrstufigen Stern
G	Freie Enthalpie
g_r	statistisches Gewicht des Zustandes r im AON-Stern
H	Enthalpie
h	helicale Konfiguration
K	Gleichgewichtskonstante der Gesamtreaktion
k_i, K_r	Gleichgewichtskonstante der Teilreaktion
K', K'_r	Ableitung der Gleichgewichtskonstanten nach s
$\vec{k}, \vec{k}$	Über-Alles-Geschwindigkeiten einer als einstufig erscheinenden Reaktion
k, k'	Hin- und Rückgeschwindigkeitskonstanten des Propagationsschrittes
k_i, k'_i	Geschwindigkeitskonstanten der Einzelreaktion i
k_n, k'_n	Geschwindigkeitskonstanten des Nukleations-schrittes
l	Abstand zweier C_α -Atome: $l=3,85 \text{ \AA}$
<u>M</u>	Transformationsmatrix
N	Polymerisationsgrad (bei Tripelhelices in Tripeptideinheiten pro Kette)
N_L	Loschmidtsche Zahl: $6,023 \cdot 10^{23} \text{ Mol}^{-1}$
N_o	Kooperative Länge $1/\bar{\theta}$: mittlere Länge einer Helixsequenz für $\theta=1/2$ und $N \rightarrow \infty$

P	Vektor der Parameter p_i
Q	Zustandssumme des Systems ($N=\text{const}$)
Q_C, Q_H	Zustandssummen für Coil- und Helixform
R	Gaskonstante: $1,987 \text{ cal} \cdot \text{Grad}^{-1} \cdot \text{Mol}^{-1}$
R_E	mittlerer Trägheitsradius
$R_{i,i+1}$	durch die Reaktion von i nach $i+1$ in der Zeiteinheit erzielter Formelumsatz
r	Zahl der in der Tripelhelix fixierten Segmente; wird auch zur Bezeichnung der entsprechenden Spezies verwendet
S	Entropie
S_d, S_o	Entropie von Nukleation und Wachstumsschritt
s	Propagationskonstante
s_o	temperaturunabhängiger Faktor in s
T	Temperatur
T_m	"Umwandlungstemperatur" für $\theta=1/2$
t	Zeit
V	Reaktionsvolumen
v_A	mittleres Volumen eines Knäuelmoleküls
$\underline{w}$	Vektor der Besetzungszahlen w_C und w_H für Coil- und Helixform
w_i	Besetzungszahlen für die spezifizierten Zustände
$\underline{W}$	Matrix der Übergangswahrscheinlichkeiten
x_i	Anderung der bezeichneten Konzentration durch die Gleichgewichtsstörung: Kurzform für δc_i
Y	absolute Zahl der im System vorhandenen Tripelhelices.
Y_o	absolute Zahl der im System vorhandenen Coil-Moleküle
y	relativer Anteil der Tripelhelices am System
y_r	relativer Anteil der Helixform r am System
y_o	relativer Anteil der Coilform am System
Z	Großkanonische Zustandssumme (für alle N)

griechische Buchstaben:

α	gemessener Winkel der optischen Drehung
$[\alpha]$	spezifische Drehung
β_r	Gewichte der Relaxationszeiten
Δ, δ	Kennzeichnung von Differenzen (s. "Zeichen")
ϵ, ζ, ξ	vorübergehend eingeführte Abkürzungen (V.36)
Θ	Umwandlungsgrad: Anteil der vorhandenen Wasserstoffbrücken an der maximal möglichen Anzahl
$\underline{\underline{\lambda}}$	Diagonalmatrix mit den Eigenwerten λ_i
λ, λ_i	Eigenwerte eines charakteristischen Polynoms; in Kap. III.A.2 (Gl. 16-20) unabhängige Variable der großkanonischen Zustandssumme
ν, μ	Nummerierung der helicalen Spezies im Sternschema; s. Gl. (V.16)
Ξ	Fehlerquadratsumme
ξ	s. Gl. (V.36)
σ	Nukleationsparameter
σ_{rr}, σ_{st}	Anteile am Nukleationsparameter: Begegnungswahrscheinlichkeit zum trimeren Berührungskomplex und sterische Einschränkung
τ_r	Relaxationszeiten
τ^*	mittlere (reziproke) Relaxationszeit (definiert in (III.24))
ψ, φ, ω	Rotationswinkel des Peptid-Rückgrats in der Nomenklatur nach Edsall et al. ⁶⁵): positive Winkel für mathematisch negative Drehung bei Blick in die Richtungen $N \rightarrow C_\alpha$, $C_\alpha \rightarrow C'$, $C' \rightarrow N$. Nullstellung: gestreckte Kette, Rückgrat in trans-Konfiguration

I. EINLEITUNG

Die Funktion der Proteine ist wesentlich durch ihre räumliche Konformation gegeben (Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur), die ihrerseits vom chemischen Aufbau (Primärstruktur) und der Umgebung (Temperatur, Lösungsmittel) abhängt. Die Röntgenstrukturanalyse zeigt, daß die Enzyme aus Polymerenketten bestehen, die auf komplizierte Art zu einer kugelhähnlichen Form gefaltet sind. Im Strukturprotein Kollagen dagegen lagern sich drei Molekülstränge zu langen, starren, verdrehten Stäbchen (Tripelhelices) aneinander, die - untereinander versetzt liegend - dem Gewebe seine Stabilität verleihen.

Der schmale Denaturierungsbereich von etwa 10 °C beim Kollagen zeigt an, daß die Strukturumwandlung kooperativ erfolgt. Die Ursache hierfür liegt in den Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Bauelementen des Moleküls, so daß die Konformation eines Segments durch diejenige seiner Nachbarsegmente mitbestimmt wird. Für die mathematische Behandlung dieser gegenseitigen Strukturstabilisierung beschränkt man sich meist auf die Betrachtung der nächsten Nachbarn, so daß man das von Ising ¹⁾ zur Beschreibung des linearen Ferromagneten eingeführte Modell übernehmen kann.

Die Auflösung der Kollagenstruktur ist im Prinzip reversibel, doch bestehen wegen der großen Länge der Molekülstränge neben der Renaturierung noch eine Reihe weiterer Reaktionsmöglichkeiten, so daß es auch bei sehr langem Abwarten zu keiner vollständigen Wiederherstellung des nativen Aufbaus kommt ^{2,3)}. Diese Nebenreaktionen machen es gegenwärtig unmöglich, aus Messungen am Kollagen detaillierte Aussagen über den Reaktionsmechanismus bei der Tripelhelixbildung zu erhalten. Man versucht deshalb, auf kürzere Ketten auszuweichen (Kollagenfragmen-

te 4-7) oder synthetische Peptide 8-11)), von denen bekannt ist, daß sie die gleiche Struktur wie Kollagen annehmen können.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, ein Reaktionsschema aufzuzeigen, mit dem die kooperative Tripelhelix-Knäuel-Umwandlung erklärt werden kann. Die theoretischen Ergebnisse werden mit eigenen (Kap. VII) und fremden 7) Gleichgewichts- und Kinetikmessungen am Kollagenfragment "CB2" 6,12) sowie mit dem Verhalten von Kollagen 13,14) und kollagenähnlichen synthetischen Peptiden 11) verglichen. Darüber hinaus sollen die Berechnungen der Konzeption von bisher fehlenden Messungen zur Kettenlängenabhängigkeit der Tripelhelix-Knäuel-Umwandlung dienen.

II. STRUKTUR UND STABILITÄT DER TRIPELHELIX

G. N. Ramachandran und G. Kartha ¹⁵⁾ haben 1955 für Kollagen eine Struktur vorgeschlagen, bei der sich die drei Einzelstränge je in Form der linkshändigen Polyprolin-II-Helix ⁸⁾ (Ganghöhe 8,6 Å bei drei Aminosäuren) zu einer rechtsgerichteten Überhelix aneinanderlagern, deren Ganghöhe 85,8 Å (30 Aminosäuren) beträgt. Mit diesem Auf-

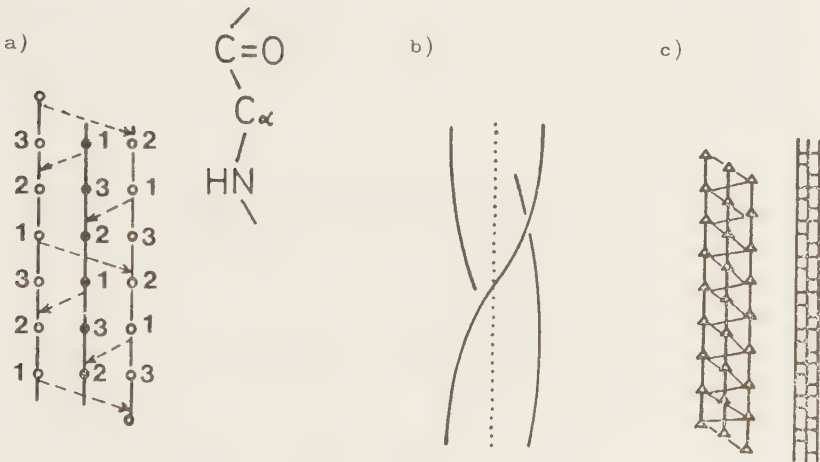


Abb. 1: Schematische Darstellung der Struktur der kollagen-II-Tripelhelix

- Anordnung der Wasserstoffbrücken. Die Einzelstranghelices sind ebenso wie die Überhelix gestreckt gezeichnet. Die mittlere Kette liegt vor den anderen, die Aminosäuren sind durch die Lage der C_{α} -Atome angedeutet und vom Glycin ausgehend nummeriert. Die Richtung der Peptidstränge ist rechts angedeutet.
- Schematischer Aufbau der Überhelix. Die Einzelstranghelices sind gestreckt dargestellt.
- Im Folgenden verwendete schematische Darstellungen der Zahl von Wasserstoffbrücken mit und ohne Berücksichtigung der relativen Höhe der Glycinreste. Jedes Dreieck bezeichnet ein Tripeptid.

bau lassen sich drei im Detail verschiedene Strukturen angeben, von denen heute das "Kollagen-II-Modell" (Rich und Crick ¹⁶⁾, Ramachandran et al. ¹⁷⁻¹⁹⁾) als gesichert gilt (Abb. 1). Bei dieser Anordnung zeigt die Seitenkette jeder dritten Aminosäure (Nr. 1 in Abb. 1a) zur Achse der Tripelhelix hin, so daß diese Position aus Platzgründen nur vom seitenkettenfreien Glycin eingenommen werden kann. Der Aminostickstoff dieses Glycins bildet eine Wasserstoffbrücke zur Carboxylgruppe der Aminosäure Nr. 2 der linken Nachbarkette aus, welche auf die gleiche Weise mit der dritten Kette verknüpft ist. Die Reste Nr. 3 bleiben ohne intermolekulare Bindung. Somit kommt eine Wasserstoffbrücke auf drei Aminosäuren jeder Kette, weshalb dieses Tripeptid als (kleinstes) "Segment" der Tripelhelix betrachtet wird.

1968 zeigten Ramachandran et al. ²⁰⁾, daß auch einzelne Polypeptidketten durch Rückfaltung eine Tripelhelix ausbilden können, wobei hier aber ein Strang in Gegenrichtung zu den beiden anderen verlaufen muß.

Die Untersuchung von Kollagensorten verschiedener Tiere zeigte, dass die Stabilität der Tripelhelix gegenüber der thermischen Denaturierung mit wachsendem Imino-

säuregehalt (Prolin $\text{---} \text{C}' \text{---} \text{C}^{\alpha} \text{---} \text{N} \text{---}$, Hydroxyprolin)

steigt ^{13,21)}. Da die Thermodynamik für die Mitte der Umwandlung (Temperatur T_m)

$$\Delta G = \Delta H - T_m \Delta S \approx 0 \quad (\text{II.1})$$

verlangt, liegt es nahe, ein Ansteigen von

$$T_m = \Delta H / \Delta S \quad (\text{II.2})$$

auf die verringerte Entropie bei Einführung einer Iminosäure zurückzuführen: der Pyrrolidinring verhindert eine

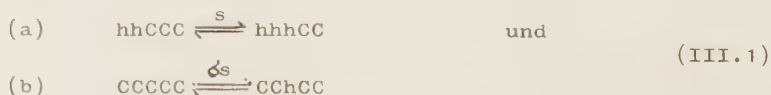
Drehung um die N-C α -Bindung, so daß der Zuwachs an Beweglichkeit bei der Denaturierung geringer bleibt als bei anderen Aminosäuren. Dagegen zeigten bereits Privalov und Tiktopulo ¹³⁾, daß ΔS mit wachsendem Gehalt an Iminosäuren ansteigt, daß dieser Effekt aber durch ein gleichzeitiges Anwachsen der Umwandlungsenthalpie überkompensiert wird. Sie vermuten ähnlich wie später A. Cooper ¹⁴⁾ einen wesentlichen Beitrag des Lösungsmittels zur Stabilisierung der Struktur, doch ist der Mechanismus einer solchen Wechselwirkung nicht bekannt. Jüngsten Untersuchungen zufolge sollte Hydroxyprolin den Aufbau der Tripelhelix stärker begünstigen als Prolin ^{22,23)}.

III. ÜBERSICHT ÜBER DIE THEORIEN FÜR KOOPERATIVE UMWANDLUNGEN BEI LINEAREN POLYMEREN

III. A. Theorien zum thermodynamischen Gleichgewicht

Besteht ein Polymer aus N Bausteinen, von denen jeder in zwei Zuständen (z.B. Helix "h" und Knäuel "C") vorliegen kann, so kann das Molekül 2^N verschiedene Zustände annehmen. Unter Vernachlässigung aller über den nächsten Nachbarn hinausreichenden intramolekularen Wechselwirkungen läßt sich die thermodynamische Zustandssumme Q aus den Wahrscheinlichkeiten für die einzelnen Konfigurationen berechnen. Die Ableitung von Q nach der Größe, deren Änderung die Umwandlung induziert, ergibt die als Umwandlungsgrad θ bezeichnete mittlere Häufigkeit z.B. des Helixzustandes. Da auch eine Reihe weiterer interessierender Größen (etwa die Schärfe der Umwandlung, die mittlere Länge einer Helix- oder Knäuelsequenz) aus der Zustandssumme gewonnen werden können ²⁴⁻²⁷), steht deren Berechnung im Mittelpunkt aller Theorien.

Im einfachsten Fall benötigt man zur Beschreibung der Thermodynamik zwei mikroskopische Gleichgewichtskonstanten, welche die drei grundlegenden Größen miteinander verknüpfen: B. H. Zimm und J. K. Bragg ²⁴) ordneten den Knäuelresten das statistische Gewicht 1 zu, jedem h innerhalb einer Helixsequenz das Gewicht s , und jedes nicht auf einen Helixrest folgende h erhielt das Gewicht $\sigma \cdot s$. Damit ergeben sich die Gleichgewichte



Der "Nukleationsparameter" σ ($0 < \sigma < 1$ für "positive Kooperativität") gibt also an, um wieviel der Aufbau einer Helixsequenz gegenüber ihrer Ausdehnung erschwert ist.

III. A. 1. Matrixmethode

Die Matrixmethode wurde von G. H. Wannier²⁸⁾ zur Berechnung des Isingmodells¹⁾ eingeführt und erstmals von Zimm und Bragg²⁴⁾ auf Biopolymere angewandt. Sind im Modell (1) die Besetzungszahlen w_C und w_h der Zustände C und h für das Segment (i-1) bekannt, so berechnet sich der Vektor $\underline{w}_i = (w_C, w_h)_i^t$ für den i-ten Baustein mit Hilfe der Übergangsmatrix

$$\underline{\underline{W}} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \sigma_s & s \end{pmatrix} \quad \text{zu} \quad (\text{III.2})$$

$$\underline{w}_i = \underline{\underline{W}} \cdot \underline{w}_{i-1} \quad (\text{III.3})$$

Mit $\underline{w}_1 = \underline{\underline{W}} \cdot \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix}$ folgt durch Iteration

$$\underline{w}_i = \underline{\underline{W}}^i \cdot \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (\text{III.4})$$

Jedes Element des Vektors $\underline{w}_i$ enthält die Summe über die Gewichte aller Zustände der Bausteine von 1 bis i-1. Ersetzt man i durch den Polymerisationsgrad N und summiert über die Komponenten von $\underline{w}_N$, so erhält man die Summe über die Gewichte aller 2^N möglichen Konfigurationen der Kette, also die Zustandssumme Q:

$$Q = (1 \ 1) \cdot \underline{\underline{W}}^N \cdot \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (\text{III.5})$$

Die Lösung der Säkulargleichung

$$|\underline{\underline{W}} - \lambda \underline{\underline{E}}| = \begin{vmatrix} 1-\lambda & 1 \\ \sigma_s & s-\lambda \end{vmatrix} = 0 \quad (\text{III.6})$$

zeigt, daß $\underline{\underline{W}}$ zu einer Diagonalmatrix $\underline{\underline{\Lambda}} = \begin{pmatrix} \lambda_1 & 0 \\ 0 & \lambda_2 \end{pmatrix}$

ähnlich ist, daß also zwei Matrizen $\underline{\underline{M}}$ und $\underline{\underline{M}}^{-1}$ existieren mit

$$(a) \quad \underline{\underline{A}} = \underline{\underline{M}}^{-1} \cdot \underline{\underline{W}} \cdot \underline{\underline{M}} \quad \text{und} \quad (III.7)$$

$$(b) \quad \underline{\underline{M}} \cdot \underline{\underline{M}}^{-1} = \underline{\underline{E}} = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix}$$

Durch Potenzieren von (7a) folgt

$$(a) \quad \underline{\underline{W}}^N = \underline{\underline{M}} \cdot \underline{\underline{A}}^N \cdot \underline{\underline{M}}^{-1} \quad \text{mit} \quad (III.8)$$

$$(b) \quad \underline{\underline{A}}^N = \begin{pmatrix} \lambda_1^N & 0 \\ 0 & \lambda_2^N \end{pmatrix}$$

Damit ergibt sich für die Zustandssumme (5)

$$Q = \begin{pmatrix} 1 & 1 \end{pmatrix} \cdot \underline{\underline{M}} \cdot \underline{\underline{A}}^N \cdot \underline{\underline{M}}^{-1} \cdot \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (III.9)$$

Explizite Berechnung der Grössen $\underline{\underline{A}}$ und $\underline{\underline{M}}$ aus $\underline{\underline{W}}$ führt schliesslich ^{24,26)} zu

$$Q = \frac{1 - \lambda_2}{\lambda_1 - \lambda_2} \cdot \lambda_1^{N+1} + \frac{\lambda_1 - 1}{\lambda_1 - \lambda_2} \cdot \lambda_2^{N+1} \quad \text{mit} \quad (III.10)$$

$$\lambda_{1,2} = \frac{1}{2} \left\{ 1+s \pm \sqrt{(1-s)^2 + 4d_s} \right\} \quad (III.11)$$

Den Anteil der Helixsegmente erhält man aus der Zustandssumme (10) mit der Formel ^{24,29)}

$$\Theta = \frac{1}{N} \frac{d \ln Q}{d \ln s} \quad (III.12)$$

Trägt man die Werte von Θ gegen den Logarithmus der Propagationskonstanten s auf, so erhält man sigmoide Kurven (s. z.B. Abb. 2, S. 23), deren Umwandlungsmittelpunkte mit wachsendem N zu kleineren Werten von s hin verschoben sind. Gleichzeitig wächst die Steilheit der Um-

wandlung. Diese Steigung ist auch ein Maß für die Kooperativität: sie nimmt - bei vorgegebener Kettenlänge - mit wachsendem σ ab. Im Grenzfall verschwindender Kooperativität ($\sigma = 1$) liefert Gleichung (12) mit (10) und (11) das bekannte Resultat

$$\Theta = \frac{c_h}{c_c + c_h} = \frac{s}{1+s} \quad (\text{III.13})$$

Für sehr lange Ketten kann der zweite Term in der Summe von Gleichung (10) vernachlässigt werden. Damit reduziert sich (12) im Umwandlungsbereich $s \approx 1$ auf

$$\Theta = \frac{d \ln \lambda_1}{d \ln s} \quad (\text{III.14})$$

Die Umwandlungsmitten $\Theta = 1/2$ liegen für alle Kooperativitäten bei $s = 1$, wobei die einzelnen Kurven je nach der Größe von σ zwischen jenen der Formel (13) (für $\sigma=1$) und der Stufenfunktion

$$\Theta = \begin{cases} 0, & s < 1 \\ 1, & s > 1 \end{cases} \quad (\text{III.15})$$

(für $\sigma=0$) verlaufen.

Zimm und Bragg bestimmten σ für die α -Helix-Knäuel-Umwandlung von Poly- γ -benzyl-L-glutamat zu ungefähr 10^{-4} . Zum Vergleich der theoretischen Ergebnisse mit experimentellen Daten nahmen sie dabei an, daß σ wegen der vorwiegend sterischen Einschränkung bei der Bildung des Helixkeimes eine rein entropische Größe ist. In diesem Fall wird die Temperaturabhängigkeit des Gleichgewichts ausschliesslich durch die mikroskopische Gleichgewichtskonstante s repräsentiert.

Mit Hilfe der Matrixmethode können auch kompliziertere Modelle berechnet werden. So verwandten Lifson und Roig ²⁵⁾ ein spezielleres Modell der α -Helix-Knäuel-Umwandlung. Eine wesentliche Erweiterung auch auf Ordnungs-Ordnungs-Übergänge ermöglichte Schwarz ^{26,27)} durch Berücksichtigung unterschiedlicher Nukleationsschwierigkeiten für die beiden Konformationen in der Mitte und an den Enden der Kette. Nach Beachtung einiger thermodynamischer Bedingungen zwischen den einzelnen Größen wird die Umwandlung mit fünf Parametern beschrieben (N , s und drei Nukleationsparameter). Im wesentlichen Unterschied zu den Resultaten früherer Theorien schneiden sich jetzt die Umwandlungskurven für verschiedene N . Mit diesem Modell konnten Winklmair et al. ³⁰⁻³²⁾ die Helix-I - Helix-II - Umwandlung von Polyprolin quantitativ erklären.

III. A. 2. kombinatorische Methoden bei mehrsträngigen Helices

Bei diesen Methoden werden die Besetzungszahlen für die einzelnen Energiestufen gesucht und über diese zur Zustandssumme aufaddiert. Die analytische Form der so gewonnenen Ausdrücke erschwert die weitere Verarbeitung, so daß Applequist ^{29,33)} den Umweg über die großkanonische Zustandssumme für die Gesamtheit sämtlicher Kettenlängen ging. Aufstellung und Auswertung der Zustandssumme bleiben aber für eine allgemeine Anwendung des Verfahrens zu aufwendig.

Demgegenüber konnte Lifson ³⁴⁾ die Behandlung kooperativer Umwandlungen bei unendlich langen Ketten durch die Einführung der "sequence generating functions" wesentlich erleichtern. Er benutzte dabei die Additivität

der freien Energie bei Vernachlässigung von Randeffekten: $F(N) = -kT \cdot \ln Q(N)$ wird proportional zur Länge N , so daß sich ein λ_1 definieren läßt mit

$$\lambda_1 := \lim_{N \rightarrow \infty} \sqrt[N]{Q(N)} \quad (\text{III.16})$$

Dieses λ_1 ist dann gemeinsamer Konvergenzradius der beiden Reihen

$$\begin{aligned} \text{(a)} \quad Z(\lambda) &= \sum_{N=0}^{\infty} Q(N) \lambda^{-N} & \text{und} \\ \text{(b)} \quad \tilde{Z}(\lambda) &= \sum_{N=0}^{\infty} \left(\frac{\lambda_1}{\lambda} \right)^N \end{aligned} \quad (\text{III.17})$$

und kann leicht aus der explizit anschreibbaren großkanonischen Zustandssumme $Z(\lambda)$ berechnet werden, da man dort die zu den Bereichen gleicher Zustände gehörenden Gewichte separieren kann. Stehen 1 und δs^j für eine ununterbrochene Sequenz von j Coil- bzw. Helixzuständen, so findet man ³⁴⁾ mit der vereinfachenden Schreibweise

$$\begin{aligned} \text{(a)} \quad \mathcal{U}(\lambda) &:= \sum_{j=1}^{\infty} 1 \cdot \lambda^j & \text{und} \\ \text{(b)} \quad \mathcal{V}(\lambda) &= \sum_{j=1}^{\infty} \delta s^j \lambda^j \end{aligned} \quad (\text{III.18})$$

den Ausdruck

$$\begin{aligned} Z(\lambda) &= f(\lambda) \cdot \sum_{i=0}^{\infty} (\mathcal{U}(\lambda) \cdot \mathcal{V}(\lambda))^i \\ &= f(\lambda) (1 - \mathcal{U}(\lambda) \cdot \mathcal{V}(\lambda))^{-1}, \end{aligned} \quad (\text{III.19})$$

wo die Funktion $f(\lambda)$ stets positiv ist. Damit erhält man den Konvergenzradius λ_1 als größte Nullstelle von

$$\mathcal{U}(\lambda) \cdot \mathcal{V}(\lambda) - 1 = 0 \quad . \quad (\text{III.20})$$

Diese letzte Beziehung ist identisch mit der Säkular-

gleichung zur Bestimmung der Eigenwerte nach der Matrixmethode: aus der Form von Q für unendlich lange Ketten folgt, daß beide Gleichungen dieselbe Größe λ berechnen.

Die Anwendung der Methode der sequence generating functions hat sich besonders in der Theorie langer mehrsträngiger Helices bewährt. Hier tragen die Knäuelregionen je nach der Anzahl n der im "Ring" zwischen den Helixabschnitten enthaltenen, weitgehend frei beweglichen Bausteine unterschiedliche statistische Gewichte, die Jacobson und Stockmayer ³⁵⁾ schon 1950 theoretisch berechneten. Ohne Verbot einer vorhergehenden Überschneidung der Ketten ("excluded volume") ermittelten sie eine mit $n^{3/2}$ abfallende Wahrscheinlichkeit für das Schließen eines Ringes zwischen zwei Ketten. Statistische Computersimulationen von Wall, Hiller und Atchison ³⁶⁾ für Gaußketten in verschiedenen Raumgittern rückten die Potenz bei Beachtung des excluded volumes in die Nähe von 2. Während das Auftreten dieser unterschiedlichen Gewichte die Anwendung der Matrixmethode aufwendig macht ³⁷⁾, konnten Goldstein und DeLisi ³⁸⁾ nach der Erweiterung der Jacobson-Stockmayer-Theorie auf die Tripelhelix mit Hilfe der sequence generating functions leicht Umwandlungskurven unter der Voraussetzung berechnen, daß die drei Stränge nicht gegeneinander versetzt sind. Auch M. Kumbar ^{39,40)} benützte die sequence generating functions zur Aufstellung einer allgemeinen Theorie der Helix-Knäuel-Umwandlung bei mehrsträngigen Molekülen unter Berücksichtigung des excluded-volume-Effektes.

In der Theorie der Strukturumwandlung bei kurzen Doppelstrangmolekülen braucht die Ringschlußwahrscheinlichkeit nicht beachtet zu werden, da zwei Keime pro Helix in diesem Fall zu unwahrscheinlich sind. So kann die relative Stabilität der Zweistrangmoleküle leicht aus

der Zahl der jeweils vorhandenen helicalen Segmente innerhalb der Doppelhelix berechnet werden (Applequist und Damle ^{41,42}) sowie Pörschke ⁴³⁻⁴⁵). Zur Beschreibung der Thermodynamik dieses Systems wird zunächst die Gleichgewichtskonstante zwischen monomeren Knäuelmolekülen auf der einen Seite und sämtlichen Dimeren ohne Unterscheidung ihres Helixgehaltes auf der anderen Seite angesetzt. Zu diesen beiden Formen gehören die Zustandssummen Q_C und Q_h , von denen letztere selbst aus weiteren Zustandssummen zusammengesetzt zu denken ist. Die Zustandssumme des Gesamtsystems wird nun durch Addition aller möglichen Verteilungen zwischen Coilmolekülen und Dimeren berechnet, das heißt, die Zahl Y_0 von Monomeren wird von 0 bis zur Gesamtzahl N_{LcV} an Einzelsträngen variiert (Loschmidt'sche Zahl N_L , molare Gesamteinwaage c an Monomeren und Volumen V des Reaktionssystems). Nach einem in der Thermodynamik gebräuchlichen Verfahren kann diese Zustandssumme wegen der hohen Anzahl von Partikeln durch ihren größten Term ersetzt werden, der durch die Gleichgewichtskonstante K zwischen Dimer und Monomer repräsentiert wird ⁴¹). Man kann deshalb das System von K ausgehend ohne explizite Angabe der Zustandssumme beschreiben, wie dies in Kapitel V.A durchgeführt wird.

III. B. Theorien zur Umwandlungskinetik

III. B. 1. Relaxationskinetik

Schreibt man die kinetischen Gleichungen eines mehrstufigen Reaktionssystems an, bei dem nicht sämtliche Einzelschritte dem Gesetz 1. Ordnung gehorchen, so erhält man ein System nichtlinearer Differentialgleichungen, welches nicht allgemein lösbar ist. Beschränkt man sich aber auf kleine Störungen des Gleichgewichtes (Relaxationskinetik), so kann man nach Umschreiben des Gleich-

chungssysteme auf die Konzentrationsänderungen an Stelle der Konzentrationen selbst die quadratisch kleinen Terme vernachlässigen (Eigen und De Maeyer⁴⁶). Das verbleibende System linearer Differentialgleichungen 1. Ordnung in der Zeit führt zu Lösungen, die sich alle durch Addition exponentiell abklingender Terme gewinnen lassen. Die zugehörigen Abklingzeiten ("Relaxationszeiten") sind die reziproken negativen Eigenwerte der Koeffizientenmatrix des Gleichungssystems.

Die in Abschnitt A vorausgesetzte Polymerenkette mit N Bausteinen kann in 2^N Konfigurationen vorliegen. Nach Einsetzen einer Erhaltungsgleichung bleiben $2^N - 1$ unabhängige Gleichungen, die zu ebenso vielen Relaxationszeiten führen. Für den zeitlichen Verlauf des Umwandlungsgrades Θ erhält man dann

$$\Theta(t) = \bar{\Theta} - \sum_{r=1}^{2^N-1} \beta_r e^{-t/\tau_r}, \quad (\text{III.21})$$

wobei

$$\sum \beta_r = \bar{\Theta} - \bar{\Theta}^0 \quad (\text{III.22})$$

die Differenz zwischen den Gleichgewichtszuständen zu Ende und zu Anfang der Reaktion ist. Die Gewichte β_r sind Funktionen des Meßeffektes sowie der beiden Gleichgewichtszustände $\bar{\Theta}$ und $\bar{\Theta}^0$. Wegen der Randbedingung $\Theta(0) = \bar{\Theta}^0$ muß die Forderung

$$\sum_{r=1}^{2^N-1} \beta_r = 1 \quad (\text{III.23})$$

erfüllt sein.

Den Reaktionsbeginn kann man nach Schwarz^{47,26,27} ohne Kenntnis des gesamten Relaxationsspektrums beschrei-

ben, da die durch

$$\frac{1}{\tau^*} := \sum_{r=1}^{2^N-1} \frac{\beta_r}{\tau_r} \quad (\text{III.24})$$

definierte "mittlere (reziproke) Relaxationszeit τ^* direkt aus der Anfangssteigung der Reaktion gewonnen werden kann:

$$\frac{1}{\tau^*} = \frac{1}{\delta\theta} \cdot \left. \frac{d\theta}{dt} \right|_{t=0} \quad (\text{III.25})$$

Sie ist daher nur eine Funktion der Randbedingungen sowie der zum neuen Gleichgewicht gehörenden Geschwindigkeitskonstanten. Die theoretische Diskussion der mittleren Relaxationszeiten bei langen Polymeren führt für verschiedene Parameter stets zu einem Maximum innerhalb des Umwandlungsbereiches ^{26,27)}. Eine experimentelle Bestimmung von τ^* aus der Anfangssteigung kann jedoch durch eine ungünstige Verteilung der Gewichte (kleine β_r zu kurzen Relaxationszeiten τ_r) oder durch eine zu hohe Totzeit des Meßsystems (gegenüber der kleinsten Relaxationszeit) verhindert werden.

Craig und Crothers ⁴⁸⁾ berechneten den zeitlichen Verlauf der Reaktionskurve unter verschiedenen Voraussetzungen numerisch mit Hilfe einer Matrix-Iteration. Dabei wird eine Matrix der Übergangswahrscheinlichkeit wiederholt auf den Vektor der Konfiguration angewandt. Ihre Ergebnisse stimmen gut mit dem analytisch berechneten Verhalten bei Schwarz und Winklmair ^{30,32)} überein.

Nach Vorarbeiten durch andere Autoren ⁴⁹⁻⁵¹⁾ beschrieb Schwarz ^{52,53)} die Kinetik mit Hilfe der mikroskopischen Reaktionsgeschwindigkeiten für die Zustände der einzelnen Bausteine, indem er in der "Triplet-Klau-

sur" beide Nachbarn eines jeden Segments in die Betrachtung mit einbezog. Für sehr lange Ketten reduziert sich das von ihm aufgestellte Gleichungssystem auf vier Gleichungen, doch ist im Fall hoher Kooperativität und langsamer Bildungsgeschwindigkeit der Helixkeime nur eine einzige Relaxationszeit meßbar ⁵³⁾, so daß eine einfache Ein-Schritt-Reaktion vorgetäuscht wird. Analytische und numerische Berechnungen ^{54,55)} in jüngster Zeit wiesen nach, daß bei nicht-infinitesimalen Gleichgewichtsänderungen auch die Triplett-Klausur nur eine - wenn auch sehr gute - Approximation darstellt. Sie gilt exakt bei irreversiblen Reaktionen ⁴⁹⁾ und beschreibt sonst die ersten drei Zeitableitungen des Umwandlungsgrades zu Beginn der Reaktion richtig ⁵⁵⁾.

III. B. 2. Steady-State-Kinetik bei Oligomeren

Bleibt die Kettenlänge beträchtlich unter der kooperativen Länge (mittlere Länge einer Helixsequenz bei sehr langen Ketten: $N_0 = 1/\sqrt{\sigma}$), so ist die Zahl der Moleküle mit einer Grenzfläche zwischen h und c verschwindend gering. Die Reaktion kann hier oft durch das Schema



bei verschwindender Konzentration der Zwischenstufen B_1 bis B_{N-1} erklärt werden: wegen $\sigma \ll 1$ muß im Umwandlungsbereich $s \gg 1$ gelten, so daß außer B_N (Gleichgewichtskonstante $K_N = \sigma s^N$ gegenüber A) nur A in meßbarer Konzentration vorliegt. Für die Reaktionskinetik macht man deshalb die Steady-State-Annahme, daß auch

die zeitliche Änderung der B_i für $1 \leq i \leq N-1$ verschwindet.

Zur Lösung der Steady-State-Kinetik betrachtet man den Umsatz jedes einzelnen Reaktionsschrittes:

$$\begin{aligned}
 R_{0,1} &= k'_n (s c_c - c_1) \\
 R_{1,2} &= k c_1 - k' c_2 \\
 R_{2,3} &= k c_2 - k' c_3 \\
 &\vdots \\
 R_{i-1,i} &= k c_{i-1} - k' c_i \\
 &\vdots \\
 R_{N-1,N} &= k c_{N-1} - k' c_N
 \end{aligned} \tag{III.27}$$

Wegen der Stationarität sind dabei alle $R_{i-1,i}$ gleich groß: $R_i = R_{i-1,i} = \dot{c}_N = -\dot{c}_c$. Division der i -ten Zeile durch s^{i-1} und Addition der Zeilen $i=2$ bis $i=N$ führen nach Eliminierung von c_1 mit Hilfe der ersten Gleichung zum Ausdruck

$$\dot{c}_N = \frac{1}{\sum_{i=0}^{N-2} s^i + s^{N-1} \cdot \frac{k'}{k_n}} \cdot \left\{ k' s^N c_c - k' c_N \right\} \tag{III.28}$$

Man erhält in der Steady-State-Kinetik also eine einzige Relaxationszeit; die "Über-Alles"-Geschwindigkeiten sind aus den Konstanten der Einzelschritte zusammengesetzt:

$$\begin{aligned}
 (a) \quad \vec{k} &= k' s^N \cdot \left[\sum_{i=0}^{N-2} s^i + s^{N-1} \cdot \frac{k'}{k_n} \right]^{-1} \\
 (b) \quad \vec{k} &= k' \cdot \left[\sum_{i=0}^{N-2} s^i + s^{N-1} \cdot \frac{k'}{k_n} \right]^{-1}
 \end{aligned} \tag{III.29}$$

Pörschke^{43,44,56)} ermittelte für den Aufbau der Doppelhelix von Oligoadenylsäure aus diesem Modell eine negative Aktivierungsenergie für $\vec{k}$ und schloß aus ihrem Betrag, daß die Bildung eines Keimes mit drei gebundenen Segmenten als schnelles Gleichgewicht der Reaktionskette vorgelagert sein muß. Craig et al.⁵⁷⁾ formulierten die Steady-State-Kinetik bei Berücksichtigung unterschiedlicher statistischer Gewichte der einzelnen Zwischenstufen. Elson^{58,59)} zeigte durch numerische Lösung des Differentialgleichungs-Systems für verschiedene Polymerisationsgrade, daß die Stationaritätsannahme erst nach einer Anlaufzeit gilt, die umso länger ist, je geringer die Kooperativität und je höher der Umwandlungsgrad sind. Seine Berechnungen zeigen ferner, daß auch alle Zwischenkonzentrationen eine zeitliche Änderung erfahren, doch verläuft diese in der Steady-State-Phase für alle Konzentrationen mit der gleichen Relaxationszeit.

IV. GRUNDLEGENDE REAKTIONEN DRITTER ORDNUNG

In den Kapiteln IV und V werden einige Reaktionsmodelle für die Tripelhelixbildung aufgestellt. Die Ergebnisse der im Kapitel IV behandelten unverzweigten Reaktionsmodelle bilden die Grundlage für vereinfachende Annahmen bei der Berechnung des verzweigten "Sternschemas" im folgenden Kapitel.

Alle Modelle erfüllen zwei Forderungen: die Gesamtreaktion verläuft in der dritten Ordnung, und ein dimeres Zwischenprodukt ist im Gleichgewicht nicht nachweisbar. Beide Einschränkungen - die zweite folgt mathematisch aus der ersten (Abschn. B.1) - entsprechen publizierten Ergebnissen ^{6,7)}, die im experimentellen Teil der Arbeit auch geprüft wurden. Wegen dieser Bedingungen tritt in allen behandelten Fällen die dimensionslose Größe σc^2 an die Stelle der Kooperativität σ bei Einzelstrangelices. Analog läßt sich das Quadrat der Konzentration in der Kinetik mit der Geschwindigkeit des Keimbildungsschrittes zusammenfassen. Die einzelnen Ergebnisse können deshalb anhand der Auftragung dimensionsloser Größen verglichen werden: $\theta/\ln s$, $\tau k c^2/\ln s$ und $\tau k c^2/\theta$.

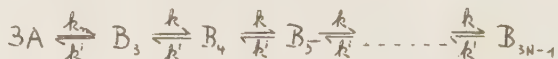
Die Eigenschaften aller Modelle wurden für die Parameter $\sigma c^2 = 10^{-8}$, 10^{-10} , 10^{-12} , 10^{-14} und 10^{-16} sowie die Kettenlängen $N = 6$, 12 und 18 Tripeptide untersucht, wobei wegen der relativen Versetzung der einzelnen Stränge (Abb. 1, S. 3) jede Tripelhelix maximal $3N-1$ Wasserstoffbrücken ausbilden kann. Die numerische Auswertung der Formeln geschah mit einem Hewlett-Packard Model-10 Calculator.

Im vorliegenden Kapitel werden folgende Reaktionsschemata untersucht.

1) Das Alles-Oder-Nichts-Modell ("AON") $3A \rightleftharpoons B$ ist das

einfachste Beispiel einer Reaktion dritter Ordnung. Seine thermodynamischen Eigenschaften und die Relaxationskinetik dienen als Vergleichsbasis für sämtliche Modelle.

- 2) In Abschnitt B.1 wird eine dimere Zwischenstufe eingeführt: $3A \rightleftharpoons A_2 + A \rightleftharpoons B$. Im Gleichgewicht sollen keine Dimeren nachweisbar sein, das thermodynamische Verhalten ist also nicht vom AON-Fall unterscheidbar und braucht nicht behandelt zu werden. In der Relaxationskinetik liegt nur dann eine Reaktion dritter Ordnung vor, wenn A_2 im schnellen "vorgelagerten Gleichgewicht" mit A steht. Schon die Annahme eines raschen Gleichgewichtes zwischen A_2 und B ergibt eine geringere Reaktionsordnung.
- 3) Auch wenn die Zwischenstufe ein Trimer beliebiger Struktur ist ($3A \rightleftharpoons A_3 \rightleftharpoons B$), führt die rasche Einstellung des Vorgleichgewichtes $3A \rightleftharpoons A_3$ zur Reaktion dritter Ordnung.
- 4) Eine weitere Verallgemeinerung stellt der Aufbau der Tripelhelix in einer Steady-State-Reaktion dar (Abschnitt C). Dabei wird zur Erzielung einer dritten Reaktionsordnung die Bildung eines tripelhelicalen Keimes mit (mindestens) drei Wasserstoffbrücken durch einen einzigen Reaktionsschritt beschrieben, in dem - aus physikalischen Gründen - vorgelagerte schnelle Gleichgewichte nach dem Muster der zuvor behandelten Modelle enthalten sind. Im Schema



werden sämtliche Propagationsschritte als gleich schnell angesetzt: k bzw. k' . Das Aufbrechen des Keimes geschieht wie der Rückwärtsschritt der Propagation durch das Öffnen einer einzigen Wasserstoffbrücke, weshalb auch hier die Geschwindigkeits-

konstante k' eingeführt wird. Zur Erhaltung der Gleichgewichtsbedingung σs^3 für den Keim muß dann die Bildungsgeschwindigkeit mit der Konstanten σ belastet werden: $k_n = \sigma s^2 \cdot k$ spiegelt die große Anzahl erforderlicher Begegnungen wider, bis es zu einem sterisch günstigen Treffen mit Aufbau des tripelhelicalen Keimes kommt.

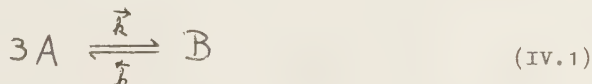
Unter diesen Voraussetzungen werden zwei Steady-State-Modelle behandelt:

- a) Ein Keim kann nur am Ende der Ketten gebildet werden, so daß die Helix nur in einer Richtung wachsen kann.
- b) Die Keimbildung erfolgt an jeder Stelle der Kette mit der gleichen Wahrscheinlichkeit wie an den Enden. Das Helixwachstum erfolge nach beiden Seiten gleich schnell; zusätzliche statistische Gewichte geben die Anzahl der Realisierungsmöglichkeiten des Helixaufbaus wider. Entsprechend dieser Möglichkeiten läuft die gesamte Reaktion schneller ab.

IV. A. Das Alles-Oder-Nichts-Modell (AON)

IV. A. 1. Thermodynamik

Es existieren nur zwei Spezies in meßbarer Konzentration: völlig geknäuelte Ketten A und völlig intakte Tripelhelices B. Zur Beschreibung des Gleichgewichts genügt das Schema



Die Stabilität der Helix sei durch die Zahl $3N-1$ der Wasserstoffbrücken bestimmt:

$$\frac{c_B}{c_A^3} = \frac{\vec{k}}{\vec{k}} = K = \sigma s^{3N-1} \quad (\text{IV.2})$$

Rechnet man auf die Anteile y_0 von Knäuel- und $y=1-y_0$ von Helixzuständen um, so gilt bei einer Gesamtkonzentration c an Einzelsträngen

$$(a) \quad y_0 = \frac{C_A}{c} \quad (IV.3)$$

$$(b) \quad y = \frac{3C_B}{c}$$

und

$$(a) \quad Kc^2 = \frac{y}{3y_0^3} = \frac{1-y_0}{3y_0^3} \quad \text{oder} \quad (IV.4)$$

$$(b) \quad y_0^3 + \frac{y_0}{3Kc^2} - \frac{1}{3Kc^2} = 0 \quad .$$

Der Umwandlungsgrad θ ist hier gleich dem Anteil y , der über y_0 leicht aus (4c) mit Hilfe der Cardanischen Formel berechnet werden kann. Auftragungen von θ gegen $\ln s$ für verschiedene Polymerisationsgrade und verschiedene Kooperativitäten sind in Abb. 2 a und b widergegeben.

Die Parallelität der Umwandlungskurven bei gleicher Kettenlänge und verschiedener Kooperativität (Abb. 2b) kann analytisch gezeigt werden: wegen (4a)

$$Kc^2 = \frac{\theta}{3(1-\theta)^3} \quad (IV.5)$$

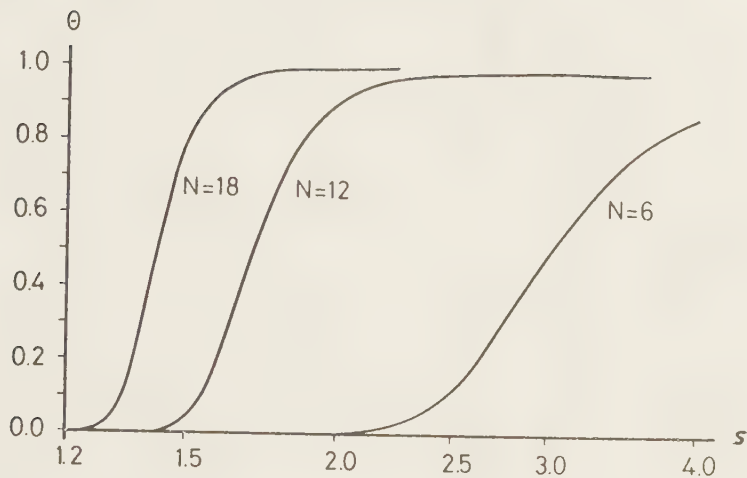
gilt nämlich

$$(a) \quad \frac{\partial K}{\partial \theta} = \frac{1}{3c^2} \cdot \frac{1+2\theta}{(1-\theta)^4} \quad \text{und somit} \quad (IV.6)$$

$$(b) \quad \frac{\partial \theta}{\partial \ln K} = K \frac{\partial \theta}{\partial K} = \frac{\theta(1-\theta)}{1+2\theta} \quad ,$$

das heißt, bei gegebenem Umwandlungsgrad θ haben sämtliche Kurven die gleiche Steigung ($\ln K$ und $\ln s$ unterscheiden sich wegen (2) nur durch den Maßstabsfaktor $3N-1$).

a)



b)

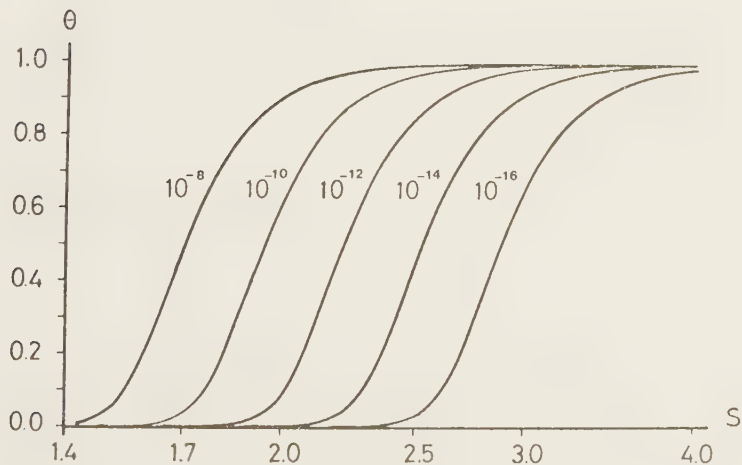


Abb. 2: Umwandlungskurven für das AON-Modell

a) Umwandlungskurven für die Kooperativität $\sigma_c^2=10^{-8}$ bei verschiedenen Kettenlängen N .

b) Umwandlungskurven für die Kettenlänge $N=12$ und verschiedene Kooperativitäten σ_c^2 .

Unter Verwendung der van't-Hoff-Beziehung

$$(a) \quad K = K_0 e^{-\frac{\Delta H}{RT}} \quad \text{bzw.} \quad (IV.7)$$

$$(b) \quad \frac{\partial \ln K}{\partial T} = \frac{\Delta H}{RT^2}$$

läßt sich auch die Umwandlungsenthalpie ΔH sofort angeben:

$$\frac{d\theta}{dT} = \frac{\partial \theta}{\partial \ln K} \cdot \frac{\Delta H}{RT^2} \quad (IV.8)$$

führt mit (6b) für $\theta = 1/2$ (bei der "Umwandlungstemperatur" T_m) auf

$$\Delta H = 8RT_m^2 \cdot \left. \frac{d\theta}{dT} \right|_{\theta=1/2} \quad (IV.9)$$

Auch die Verschiebung der Umwandlungstemperatur bei Veränderung der Konzentration wird durch den Enthalpieumsatz bestimmt. Für konstantes θ gilt

$$\ln Kc^2 = \text{const.} = \ln K_0 - \frac{\Delta H}{RT} + 2 \ln c \quad (IV.10)$$

Trägt man also $\ln c$ über der reziproken Umwandlungstemperatur auf, so erhält man die Steigung $\Delta H/2R$.

IV. A. 2. Relaxationskinetik im AON-Modell

Die einzige Relaxationszeit der Reaktion (1) kann direkt nach der bei Eigen und De Maeyer⁴⁶⁾ beschriebenen Methode berechnet werden. Nach Umschreiben auf die Anteile y_0 und y an Stelle der Konzentrationen erhält man

$$\frac{dy}{dt} = k_c^2 \left(3y_0^3 - \frac{1}{Kc^2} y \right) \quad (IV.11)$$

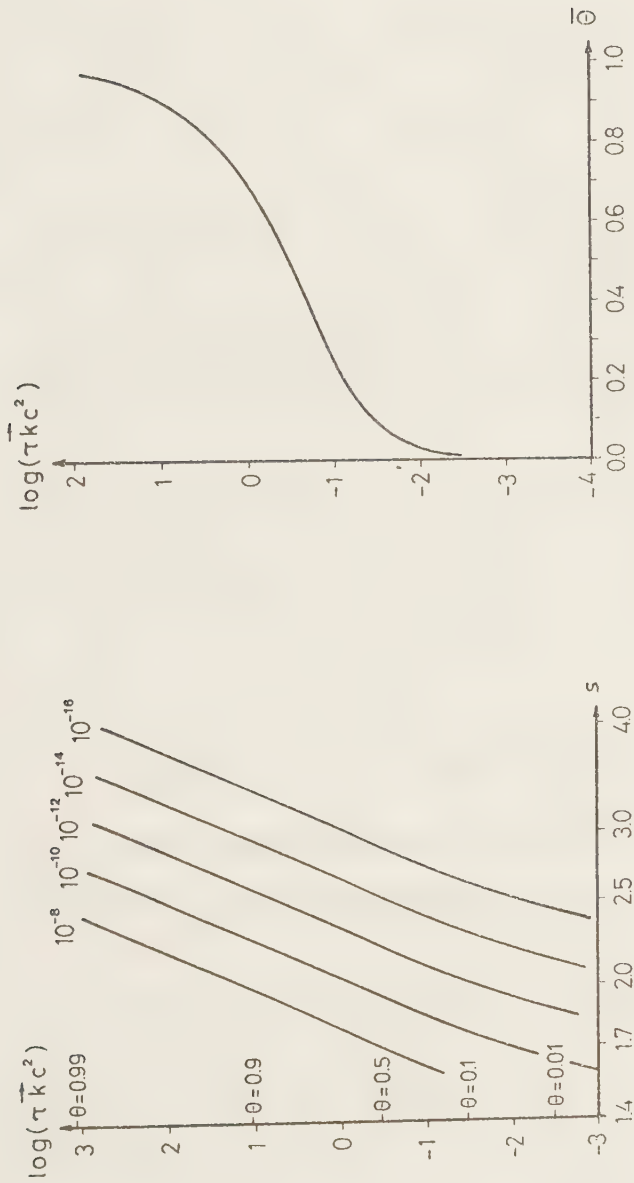


Abb. 3: Normierte Relaxationszeiten $\tau \bar{k} c^2$ für das AON-Modell

- a) in Abhängigkeit vom Parameter s
 bei fester Kettenlänge $N=12$ und
 verschiedenen Kooperativitäten.
- b) als Funktion vom Umwandlungsgrad
 ist $\tau \bar{k} c^2$ unabhängig von Ketten-
 länge und Kooperativität.

und nach der Linearisierung

$$(a) \quad \frac{1}{\tau \bar{k} c^2} = \bar{y}_i^{-1} + \frac{1}{\bar{k} c^2} \quad \text{oder} \quad (IV.12)$$

$$(b) \quad \frac{1}{\tau \bar{k} c^2} = 3 \cdot \frac{(1-\bar{\theta})^2 \cdot (2\bar{\theta}+1)}{\bar{\theta}}$$

(Die gestrichelten Größen beziehen sich auf den neuen Gleichgewichtszustand).

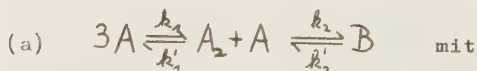
Während diese normierte Relaxationszeit $\tau \bar{k} c^2$ als Funktion von $\bar{K}$ bzw. $\bar{s} = (\bar{K}/\sigma)^{1/(3N-1)}$ von den Parametern N und σc^2 abhängt, ist sie als Funktion des Umwandlungsgrades bezüglich dieser beiden Größen konstant (Abb. 3 a und b).

Im Unterschied zu den Berechnungen von Schwarz^{26,27)} läuft $\tau k c^2$ nicht durch ein Maximum. Diese Abweichung ist eine Folge der geringen Kettenlänge, welche die Näherung $s \approx 1$ innerhalb des gesamten Umwandlungsbereiches verbietet.

IV. B. Zweistufen-Modelle

IV. B. 1. Ausbildung einer Dimeren-Zwischenstufe.

Verläuft die Trimerenbildung über die Zwischenstufe eines Dimeren, so gilt das Schema



$$(b) \quad \frac{\bar{c}_{A_2}}{\bar{c}_A^2} = \frac{k_1}{k_1'} = K_1; \quad \frac{\bar{c}_B}{\bar{c}_{A_2} \cdot \bar{c}_A} = \frac{k_2}{k_2'} = K_2; \quad (IV.13)$$

und

$$(c) \quad K := K_1 \cdot K_2,$$

wobei im Umwandlungsbereich

$$K \bar{c}_A^2 = \frac{\bar{c}_B}{\bar{c}_A} \approx 1 \quad (\text{IV.14})$$

gelten muß. Die Erhaltungsgleichung ist

$$c_A + 2c_{A_2} + 3c_B = \bar{c}_A + 2\bar{c}_{A_2} + 3\bar{c}_B \quad (\text{IV.15})$$

und das Differentialgleichungssystem der Kinetik lautet

$$\begin{aligned} \frac{dc_A}{dt} &= -2k_1 c_A^2 + 2k_1' c_{A_2} - k_2 c_A c_{A_2} + k_2' c_B \\ \frac{dc_{A_2}}{dt} &= k_1 c_A^2 - k_1' c_{A_2} - k_2 c_A c_{A_2} + k_2' c_B \\ \frac{dc_B}{dt} &= k_2 c_A c_{A_2} - k_2' c_B \end{aligned} \quad (\text{IV.16})$$

Mit den Abkürzungen

$$\begin{aligned} \text{(a)} \quad \Sigma k &:= 4k_1 \bar{c}_A + k_1' + k_2 (\bar{c}_A + \bar{c}_{A_2}) + k_2' \\ &= k_1' \cdot (4K_1 \bar{c}_A + 1) + k_2' (K \bar{c}_A^2 + K_2 \bar{c}_A + 1) \\ \text{(b)} \quad \Pi k &:= 6k_1 k_2 \bar{c}_A^2 + 4k_1 k_2' \bar{c}_A + 3k_1 k_2 \bar{c}_{A_2} + k_1' k_2' \\ &= k_1' k_2' \cdot (9K \bar{c}_A^2 + 4K_1 \bar{c}_A + 1) \end{aligned} \quad (\text{IV.17})$$

erhält man die beiden Relaxationszeiten ⁴⁶⁾

$$\frac{1}{\tau_{1,2}} = \frac{1}{2} \left[\Sigma k \pm \sqrt{(\Sigma k)^2 - 4 \Pi k} \right] \quad (\text{IV.18})$$

Zwischen ihnen gelten die Beziehungen

$$\begin{aligned} \text{(a)} \quad \frac{1}{\tau_1} + \frac{1}{\tau_2} &= \Sigma k \quad \text{und} \\ \text{(b)} \quad \frac{1}{\tau_1} \cdot \frac{1}{\tau_2} &= \Pi k \end{aligned} \quad (\text{IV.19})$$

Nach dem vorhergehenden Abschnitt (Gleichung (12a)) läßt sich die Relaxationszeit einer Reaktion dritter Ordnung in der Form $\frac{1}{\tau} = 9\bar{k}\bar{c}_A^2 + \bar{k}$ schreiben. Ein solcher Ausdruck ist im vorliegenden Fall nur zu erwarten, wenn die in $\bar{c}_A$ linearen Terme von Σk oder Πk gegenüber den anderen Summanden vernachlässigbar sind. Wie im folgenden gezeigt wird, führen alle hieraus resultierenden Bedingungen auf die Spezialfälle, daß eine der beiden Teilreaktionen von (13a) sehr viel schneller als die Gesamtreaktion abläuft. Bezüglich dieser Gesamtreaktion befindet sich deshalb A_2 stets im Gleichgewicht mit A oder B, wobei nur der erste Fall eine Reaktion dritter Ordnung ergeben wird.

IV. B. 1. a. Reaktion 3. Ordnung bei vorgelagertem schnellen Gleichgewicht zwischen A_2 und A

Diesen Fall erhält man unter den folgenden Voraussetzungen:

- (a) $K_1\bar{c}_A \ll K\bar{c}_A^2$ oder $1 \ll K_2\bar{c}_A$
- (b) $K_1\bar{c}_A \ll 1$ (IV.20)
- (c) $k'_1 \gg k_2\bar{c}_A$

Die Voraussetzungen (a) und (b) beschreiben die Annahme, daß die Gleichgewichtskonzentration des Dimeren verschwindet. Mathematisch werden sie zur Vernachlässigung des in $\bar{c}_A$ linearen Termes von Πk (17b) benötigt. Die Bedingung (c) ist erforderlich, wenn man für die Berechnung von τ_1 nach (18) die Näherung $\sqrt{(\Sigma k)^2 - 4\Pi k} \approx \Sigma k$ vornehmen will. Nur in diesem Fall gewinnt man nämlich

die einfache Form

$$\frac{1}{\tau_1} = \sum k = k_1' (4K_1 \bar{c}_A + 1) \quad . \quad (\text{IV.21})$$

Wegen (19a) muß $1/\tau_1 \gg 1/\tau_2$ sein, und aus den beiden Gleichungen (19) erhält man die dieser Ungleichung äquivalenten Beziehungen

$$(a) \quad \frac{1}{\tau_1} = \sum k \quad (\text{IV.22})$$

$$(b) \quad \frac{1}{\tau_2} = \pi R / \sum k \quad .$$

τ_1 beschreibt also die schnelle Einstellung des Gleichgewichts zwischen A_2 und A unabhängig vom darauffolgenden Reaktionsschritt. Für

$$\frac{1}{\tau_2} = \frac{k_1' k_2' (9K_1 \bar{c}_A^2 + 1)}{k_1' (4K_1 \bar{c}_A + 1)} \quad (\text{IV.23})$$

(aus (22b)) erhält man mit der Bedingung (20b) die gewünschte Reaktion dritter Ordnung:

$$\frac{1}{\tau_2} = 9k_2 K_1 \bar{c}_A^2 + k_2' \quad (\text{IV.24})$$

Ein Vergleich mit dem AON-Modell bringt

$$(a) \quad \vec{k} = k_2 \cdot K_1 \quad \text{und} \quad (\text{IV.25})$$

$$(b) \quad \overleftarrow{k} = k_2' \quad .$$

Setzt man für die Geschwindigkeitskonstanten die Arrhenius-Gleichung

$$k = k_c e^{-\frac{AE}{RT}} \quad (\text{IV.26})$$

mit der positiven Aktivierungsenergie AE an, so wird die Temperaturabhängigkeit von $\vec{k}$ wegen der van't-Hoff-Beziehung (7) für K_1

$$\vec{k} = \text{const.} \cdot e^{-\frac{(AE + \Delta H)}{RT}} \quad . \quad (\text{IV.27})$$

Ist mit der Dimerenbildung ein Enthalpiegewinn $-\Delta H > AE$ verbunden, so findet man für die meßbare Konstante $\vec{k}$ eine negative Temperaturabhängigkeit: mit wachsender Temperatur nimmt die Geschwindigkeit ab.

IV. B. 1. b. Schnelles Gleichgewicht zwischen A_2 und B

Die Vernachlässigbarkeit der in $\bar{c}_A$ linearen Terme von Σk kann durch mehrere Gruppen von Bedingungen erzwungen werden. Sie führen alle - soweit sie sich nicht selbst widersprechen - zum vorgelagerten schnellen Gleichgewicht des vorigen Abschnittes oder zu einem schnellen Gleichgewicht zwischen A_2 und B. Im letzteren Fall lauten die Forderungen

- (a) $K_1 \bar{c}_A \ll 1$
- (b) $K_2 \bar{c}_A \gg 1$ (IV.28)
- (c) $k'_1 \ll k_2 \bar{c}_A$.

Die Bedingungen (a) und (b) beschreiben wie beim vorgelagerten Gleichgewicht die geringe Konzentration von A_2 , Bedingung (c) stellt die rasche Einstellung des Gleichgewichts zwischen A_2 und B dar. Mit ihr allein findet man

$$\Sigma k = k'_1 (K_1 \bar{c}_A^2 + K_2 \bar{c}_A + 1) = k_2 \bar{c}_A \left(K_1 \bar{c}_A + 1 + \frac{1}{K_2 \bar{c}_A} \right) \quad (\text{IV.29})$$

und daraus

$$(\Sigma k)^2 = k_1' k_2 \bar{c}_A (K \bar{c}_A^2 + K_2 \bar{c}_A + 1) \left(K_1 \bar{c}_A + 1 + \frac{1}{K_2 \bar{c}_A} \right) \quad (\text{IV.30})$$

Aus dieser Form sieht man, daß Πk wieder gegenüber $(\Sigma k)^2$ vernachlässigbar ist, doch beschreibt die schnelle Reaktion jetzt den zweiten Reaktionsschritt unabhängig vom ersten: (22a) und (29) ergeben mit der ersten Gleichung von (13b)

$$\frac{1}{\tau_2} = k_2 (\bar{c}_A + \bar{c}_{A_2}) + k_2' \quad (\text{IV.31})$$

Zur Berechnung der langsamen Relaxationszeit werden nun die Bedingungen (28a) und (28b) zusammen mit (14) in (22b) eingesetzt:

$$\frac{1}{\tau_2} = \frac{k_1' k_2' (g K \bar{c}_A^2 + 1)}{k_2' \cdot g K_2 \bar{c}_A} = \frac{k_1'}{K_2 \bar{c}_A} (g K \bar{c}_A^2 + 1) \quad (\text{IV.32})$$

Im Fall des schnellen Gleichgewichts zwischen A_2 und B findet man demnach keine Reaktion dritter Ordnung.

IV. B. 2. Existenz einer trimeren Zwischenstufe

Das Auftreten einer trimeren Zwischenstufe A_3 beliebiger Struktur nach dem Schema



$$(b) \quad K_1 = \frac{\bar{c}_{A_3}}{\bar{c}_A^3} \quad \text{und} \quad K_2 = \frac{\bar{c}_B}{\bar{c}_{A_3}}$$

kann mit den neuen Abkürzungen

$$(a) \quad \Sigma k = g k_1 \bar{c}_A^2 + k_1' + k_2 + k_2' = k_1' (g K \bar{c}_A^2 + 1) + k_2' (K_2 + 1) \quad (\text{IV.34})$$

$$(b) \quad \Pi k = g k_1 \bar{c}_A^2 (k_2 + k_2') + k_2' k_2 = k_1' k_2' [g K \bar{c}_A^2 (K_2 + 1) + 1]$$

ebenso behandelt werden wie der Fall des dimeren Zwischenproduktes. Für die Bedingungen

- (a) $K_2 \gg 1$
- (b) $K_1 \bar{c}_A^2 \ll 1$ (IV.35)
- (c) $k_1' \gg k_2$

erhält man die beiden Relaxationszeiten bei Existenz des vorgelagerten schnellen Gleichgewichtes $3A \rightleftharpoons A_3$:

- (a) $\frac{1}{\tau_1} = k_1' (9K_1 \bar{c}_A^2 + 1)$ (IV.36)
- (b) $\frac{1}{\tau_2} = k_2' (9K_1 \bar{c}_A^2 + 1) = 9k_2 K_1 \bar{c}_A^2 + k_2'$

Der Abbau von B erfolgt demnach unabhängig vom Gleichgewicht zwischen A_3 und A: $\bar{k} = k_2'$. Die Geschwindigkeitskonstante $\bar{k}$ des Aufbaus wird dagegen durch die ungünstige Lage des Gleichgewichts $3A \rightleftharpoons A_3$ stark gegenüber k_2 verringert.

Allgemein werden die beiden Relaxationszeiten durch Gleichung (18) beschrieben. Zur Berechnung ihrer Gewichte β_1 und β_2 müßten die Meßsignale der Reaktionspartner bekannt sein (Kap. III.B.1, S. 14). Als schwache Voraussetzung erscheint die Annahme, daß das Signal von A_3 auf Grund einer weniger geordneten Struktur (im Vergleich zur Tripelhelix B) zwischen den Signalen von Knäuel und fertiger Tripelhelix liegt. Unter dieser Bedingung besitzt die kurze Relaxationszeit τ_1 nach Ikai und Tanford⁶⁰⁾ in genau einer der beiden Sprungrichtungen eine negative Amplitude: die Relaxationskurve $\beta_1 e^{-t/\tau_1} + \beta_2 e^{-t/\tau_2}$ besitzt also einen Anlaufteil und verläuft bei logarithmischer Auftragung von $|\bar{\theta} - \theta|$ gegen die Zeit t wegen $\beta_1 > 1$ oberhalb der Geraden $\log |\bar{\theta} - \theta| = -t/\tau_2 + |\bar{\theta}|$. In dieser Richtung erscheint die Gesamtreaktion trotz der Beteiligung eines schnellen Schrittes gegenüber einer einfachen Reaktion mit derselben Zeitkonstanten τ_2 verzögert.

IV. C. Steady-State-Reaktionen bei langsamer Keimbildung in einem Reaktionsschritt 3. Ordnung

IV. C. 1. Einfache Reaktionskette

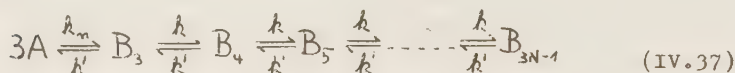
Die Annahme einer Steady-State-Reaktion beruht auf der Vorstellung, daß der Nukleationsschritt die Geschwindigkeit des gesamten Helixaufbaus bestimmt. Grundlage dieser Auffassung ist das in Kapitel VI näher zu besprechende Modell von der Nukleation, dem zufolge σ im Gleichgewicht aus zwei Anteilen zusammengesetzt ist: σ_T ist eng mit der Wahrscheinlichkeit für die Begegnung dreier verknäuelter Einzelstränge zum "Berührungskomplex" eines Trimers verknüpft, σ_H berücksichtigt die Einschränkung der sterischen Möglichkeiten jeder einzelnen Kette durch die Nachbarschaft zu den beiden anderen Strängen. Diesem Bild von der geringen statistischen Wahrscheinlichkeit für den geordneten Zustand des Keimes entspricht in der Kinetik die Vorstellung, daß zur Nukleation zahlreiche Begegnungen erforderlich sind, bis es zur günstigen sterischen Anordnung kommt, bei der sich die Wasserstoffbrücken ähnlich wie beim Propagationsschritt rasch schließen. Umgekehrt sollte das Aufbrechen der letzten Wasserstoffbrücke des Keimes vergleichbar sein mit der Rückreaktion des Propagationsschrittes.

Die Bildung des trimeren Berührungskomplexes kann man als diffusionskontrollierte, schnelle vorgelagerte Reaktion betrachten. Nach der obigen Vorstellung wird der Aufbau des Keimes dann analog zu Gleichung (36b) des vorigen Abschnitts um den vollen Wert von σ gegenüber dem Helixwachstum verlangsamt.

Die kleinste tripelhelicale Einheit muß je ein Segment einer jeden Kette sterisch fixieren, was dem

Schließen von drei Wasserstoffbrücken entspricht. Es wird deshalb in allen folgenden Modellen B_3 als Keim angenommen.

Zusammengefaßt ergibt sich für die Steady-State-Kinetik der Tripelhelixbildung als einfachstes das folgende Schema:



$$\text{mit } \frac{k_n}{k'} = \sigma s^3 \quad \text{oder} \quad k_n = \sigma s^3 k \quad . \quad (\text{IV.38})$$

Die Gesamtbilanz (III.28) geht damit über in

$$\dot{y}_{3N-1} = (3k\sigma c^2 s^{3N-1} y_0^3 - k' y_{3N-1}) / \sum_{i=0}^{3N-4} s^i \quad (\text{IV.39})$$

(die Anteile y entsprechen der Definition (3)),

und die makroskopischen Geschwindigkeiten sind

$$\begin{aligned} \text{(a)} \quad \vec{k} &= k' \sigma s^{3N-1} / \sum_{i=0}^{3N-4} s^i = k' \sigma s^{3N-1} (s-1) / (s^{3N-3} - 1) \quad \text{oder} \\ \text{(b)} \quad \vec{k} &= k' / \sum_{i=3}^{3N-1} \frac{1}{\sigma s^i} \quad \text{und} \quad (\text{IV.40}) \\ \text{(c)} \quad \overleftarrow{k} &= k' / \sum_{i=0}^{3N-4} s^i = k' (s-1) / (s^{3N-3} - 1) \quad . \end{aligned}$$

Die Gleichgewichtskonstante der Gesamtreaktion bleibt erhalten: $\vec{k}/\overleftarrow{k} = \sigma s^{3N-1}$. Die Formen (40 b und c) beider "Über-Alles-Geschwindigkeiten" gehorchen einem Prinzip, dessen allgemeine Gültigkeit aus der Gewinnung

von Gleichung (III.28) auf S. 17 folgt: man erhält sie als den Quotienten aus der mikroskopischen Rückgeschwindigkeit und der Summe über die Gleichgewichtskonstanten des Ausgangszustandes zu allen helicalen Zwischenstufen. Sind nicht alle Rückflußgeschwindigkeiten gleich, so wird k' des letzten Reaktionsschrittes ausgeklammert und jeder Summand im Nenner mit k'/k'_1 multipliziert (s. z.B. (III.26) oder die von Craig et al. 57) abgeleiteten Formeln).

Liest man (39) als AON-Reaktion mit den Geschwindigkeiten (40), so gibt Gleichung (12a) (S. 26) die zugeordnete Relaxationszeit an. Da bei der Definition der Gleichgewichtskonstanten $K=\vec{k}/\bar{k}$ die Konzentrationen der Zwischenzustände vernachlässigt worden sind, tritt eine Verschiebung der Θ -Werte auf, so daß (12b) nicht mehr gilt. Wie Populationsanalysen 43) zeigen, ist diese Korrektur aber nur gering.

Aus (40a) folgt eine Näherung für den Grenzfall sehr kurzer Ketten: im Umwandlungsbereich ist $s \gg 1$, so daß $\vec{k} \approx k' s^3 = k_n$. Ein anderer Grenzfall widerspricht zwar der Stationaritätsbedingung, gibt jedoch eine untere Schranke für $\vec{k}$, welches eine monotone Funktion von s ist: für $s=1$ ist $\vec{k} = k_n/(3N-3)$. Beide Grenzen ergeben die im ganzen Umwandlungsbereich gültige Abschätzung

$$\frac{k_n}{3N-3} < \vec{k} < k_n \quad (\text{IV.41})$$

IV. C. 2. Berücksichtigung verschiedener statistischer Gewichte der Reaktanden

Für die Kinetik käme man mit dem einfachen Steady-State-Modell (37) aus, wenn man die Keimbildung nur an

einem Ende zuließe. Diese Einschränkung verlangt zur Beschreibung der Thermodynamik drei Nukleationsparameter. Physikalisch realistischer erscheint die Möglichkeit, daß der Keim überall längs der einzelnen Ketten gebildet werden kann. In der Thermodynamik reicht dann ein einziges σ aus, doch müssen nun in der Reaktionskinetik zusätzliche statistische Gewichte eingeführt werden, da jeder Zwischenzustand B_i ($3 \leq i \leq 3N-2$) auf verschiedene Arten reagieren kann.

Die wesentliche Annahme dieses Abschnitts muß ohne Begründung als Vereinfachung eingeführt werden: die Reaktionsgeschwindigkeiten k und k' sollen den Auf- bzw. Abbau eines helicalen Segmentes beschreiben, unabhängig ob dieses am Amino- oder Carboxylende der Helixsequenz steht. Damit kann sich eine Helixregion im Innern der Ketten doppelt so schnell ausbreiten wie eine an ein Kettenende stoßende Sequenz. Der Abbau einer jeden Helixsequenz - einschließlich des Keimes B_3 - kann unabhängig von ihrer Lage bezüglich der Ketten von beiden Enden her erfolgen: k' des einfachen Modells wird durch $2k'$ ersetzt.

Nach dem zu den Gleichungen (40 b und c) Gesagten läßt sich die Steady-State-Kinetik sofort anschreiben, wenn man zur Zahl i der Wasserstoffbrücken einer jeden Zwischenstufe die Anzahl $(3N-1-(i-1))=(3N-i)$ ihrer Realisierbarkeiten hinzunimmt:

$$\begin{aligned} \dot{y}_{3N-1} &= \left(3y_0^3 c^2 \frac{2k^i}{\sum_{i=3}^{3N-1} \frac{1}{(3N-i)\sigma^i}} - y_{3N-1} \frac{2k'}{\sum_{i=0}^{3N-4} \frac{s^i}{i+1}} \right) \\ &= \frac{2k^i \delta^2 c^3}{\sum_{i=0}^{3N-4} \frac{1}{(3N-i-3)s^i}} \cdot \left(3y_0^3 - \frac{y_{3N-1}}{\delta^2 c^{3N-1}} \right) \end{aligned} \quad (\text{IV.42})$$

Gleichung (42) ist analog zu (39) aufgebaut, doch kann jetzt keine Abschätzung für $\vec{k}$ mehr gegeben werden, da sich die Summanden im Nenner aus zwei gegenläufig von i abhängenden Faktoren zusammensetzen.

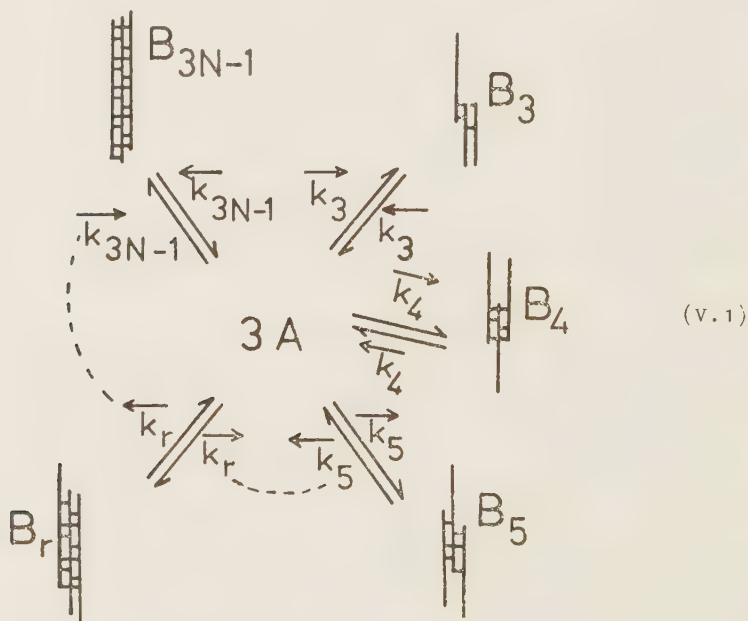
Im Vergleich zu den makroskopischen Geschwindigkeitskonstanten (40 b und c) besitzen $\vec{k}$ und $\overleftarrow{k}$ in (42) außer dem Faktor 2 einen kleineren Nenner, so daß die Gesamtreaktion beträchtlich schneller abläuft.

V. ZUM STERNSCHEMA ERWEITERTES REAKTIONSMODELL

V. A. Modell und Voraussetzungen

V. A. 1. Reaktionsmechanismus

Das Sternschema berücksichtigt die Relativverschiebungen der einzelnen Ketten nach dem Muster des von Applequist und Damle ⁴²⁾ zur Beschreibung der Thermodynamik der Oligoadenylsäure-Doppelhelix eingeführten "staggering-zipper"-Modells:



mit $\frac{\vec{k}_r}{\overleftarrow{k}_r} = K_r$. (V.2)

Die Kettenlänge wird so kurz angenommen, daß nur eine Helixsequenz pro Trimer berücksichtigt werden muß, zusätzliche Parameter durch Ringschluß 35-40) oder doubling back 20) also unberücksichtigt bleiben können. Ebenso kann dann auch eine Aggregation weiterer Monomere an den über die Helixregion hinausreichenden Kettenenden wegen deren Kürze vernachlässigt werden.

In Anlehnung an das einfache Modell von Zimm und Bragg 24) wird jede Helixsequenz unabhängig von ihrem Ort innerhalb der Ketten mit demselben Nukleationsparameter belastet. Physikalisch bedeutet dies, daß der Aufbau des Helixkeimes an jeder Stelle gleich schwierig ist, was bei Annahme hoher sterischer Restriktionen durch die Nähe der anderen Ketten (Kap. VI.C) als Ursache der Kooperativität begründet erscheint. Diese Einführung einer einzigen Nukleationskonstante ist gleichwertig mit der Forderung, daß sich die Coil-Form an den Helixenden - also auch am Kettenende - ohne Keimbildungsschritt ausbilden kann.

In Abschnitt B wird die Thermodynamik zweier Varianten des Sternschemas besprochen:

- 1) Im "AON-Stern" wird die der Kettenversetzung entsprechende maximale Anzahl von Wasserstoffbrücken nach dem Muster des AON-Schemas geschlossen.
- 2) Im "mehrstufigen Stern" wird berücksichtigt, daß auch den Zwischenstufen in jedem Reaktionsstrahl eine thermodynamische Wahrscheinlichkeit zukommt.

In der Reaktionskinetik (Abschnitt C) wird jeder Reaktionsstrahl durch einen einzigen Reaktionsschritt dargestellt. Es muß daher der "AON-Stern" zugrunde gelegt werden; die einzelnen Modelltypen unterscheiden sich nur in den Ansätzen für die Geschwindigkeitskonstanten $\vec{k}_r$, womit wegen der Gleichgewichtsbedingung zwi-

schen A und B_r auch $\overleftarrow{k}_r$ gegeben ist. Die Abschätzungen für $\overrightarrow{k}_r$ basieren auf der bereits im Steady-State-Schema (IV.37) vorweggenommenen und auf S. 33 begründeten Annahme, daß die Auflösung k'_n des Keimes ebenso schnell erfolgt wie der Abbau k' jeder anderen Wasserstoffbrücke.

Im einzelnen werden folgende Ansätze für $\overrightarrow{k}_r$ untersucht:

- 1) Im "einstufigen AON-Stern" gilt die nach (IV.41) maximal mögliche Geschwindigkeit: $\overrightarrow{k}_r = k_n$ ist unabhängig von der zu bildenden Spezies r .
- 2) Keine prinzipiellen Unterschiede erhält man bei Einsetzen der unteren Grenze von (IV.41) ($\overrightarrow{k}_r = k_n/r$) oder Multiplikation von k_n mit anderen Potenzen von r .
- 3) Explizites Einsetzen der Steady-State-Modelle (Kap. IV.C. 1 und 2) führt schließlich zum "einfachen" und "allgemeinen Steady-State-Stern". Für letzteren wird die Voraussetzung mit übernommen, daß eine Helixregion an beiden Enden - bis zum Kettenende hin - gleich schnell wächst.

V. A. 2. Annahmen zum Meßsignal

Wegen der zugelassenen Versetzungen der Einzelstränge befinden sich in der Lösung auch Helices, die weniger als die maximal möglichen $3N-1$ Wasserstoffbrücken aufweisen. Bei Molekulargewichtsbestimmungen werden sie zwar gleichwertig als Trimere gemessen, doch sind Ordnungszustand und Stabilität durch die Zahl r der intermolekularen Bindungen bestimmt. Daher müssen die für das AON-Modell ausreichenden Beziehungen (IV.3) erweitert werden: Für die Konzentrationen gilt der Erhaltungssatz (3), aus

den Definitionen (4a) folgt seine Formulierung für die Anteile (4b):

$$c_A + 3c_B = c_A + 3 \sum_{r=3}^{3N-1} c_r = c \quad (V.3)$$

$$(a) \quad y_c = \frac{c_A}{c}; \quad y = \frac{3c_B}{c}; \quad y_r = \frac{3c_r}{c} \quad (V.4)$$

$$(b) \quad y_0 + y = y_0 + \sum_{r=3}^{3N-1} y_r = 1$$

Die Erhaltungsgleichungen für die Änderungen x_r der Konzentrationen c_r und δy_r der Anteile y_r sind

$$(a) \quad x_A + 3 \sum_{r=3}^{3N-1} x_r = 0 \quad (V.5)$$

$$(b) \quad \delta y_0 + \sum_{r=3}^{3N-1} \delta y_r = 0$$

Sämtliche Berechnungen gehen von der Annahme aus, daß das Meßsignal (z.B. die Änderung der optischen Aktivität gegenüber jener der reinen Knäuelform) dem Ordnungszustand und damit dem relativen Anteil der Wasserstoffbrücken zur maximal möglichen Anzahl proportional ist. Der Umwandlungsgrad ist damit

$$\Theta = \frac{1}{3N-1} \sum_{r=3}^{3N-1} r \cdot y_r \quad (V.6)$$

Mit den Gleichgewichtskonstanten

$$(a) \quad K_r = \frac{c_r}{c_A^3} \quad \text{oder} \quad K_r c^2 = \frac{y_r}{3y_0^3} \quad (V.7)$$

$$(b) \quad K = \sum_{r=3}^{3N-1} K_r \quad \text{bzw.} \quad K c^2 = \frac{1-y_0}{3y_0^3}$$

und ihren Ableitungen nach s

$$\begin{aligned} \text{(a)} \quad K'_r &= \frac{dK_r}{ds} \\ \text{(b)} \quad K' &= \sum_{r=3}^{3N-1} K'_r \end{aligned} \quad (\text{V.8})$$

erhält man daraus die Ausdrücke

$$\Theta = \frac{3y_0^3}{3N-1} \sum_{r=3}^{3N-1} r \cdot s^r = \frac{3y_0^3}{3N-1} s K'_c \quad (\text{V.9})$$

oder

$$\Theta = \frac{1-y_c}{3N-1} \cdot \frac{s K'}{K} \quad (\text{V.10})$$

Die allgemein geltende Formel (10) läßt sich auch ohne Annahme für K mit Hilfe der Maximums-Methode aus der Zustandssumme Q und der Bedingung (III.12) ableiten (s.a. S. 13):

$$Q = \sum_{Y_c=0}^{N_LcV} \frac{Q_c^{Y_c} \cdot Q_h^{\frac{1}{3}(N_LcV - Y_c)}}{Y_c! \cdot \left[\frac{1}{3}(N_LcV - Y_c) \right]!} \quad (\text{V.11})$$

Dabei bezeichnet der große Buchstabe Y_0 die absolute Anzahl der in der Lösung vorhandenen Knäuelmoleküle (insgesamt sind N_LcV Einzelstränge im Reaktionsvolumen V) und Q_c bzw. Q_h bedeuten die Zustandssummen für Knäuel und Helix (letztere setzt sich aus den Zustandssummen aller Helixspezies zusammen).

Ersetzt man die Summe in (11) durch ihren größten Term mit $Y_0 = \bar{Y}_0$ und führt in die Maximumsbedingung die Gleichgewichtskonstante ein (12), so erhält man den Aus-

druck (13) für die Zustandssumme:

$$\frac{Q_h}{Q_c^3} = \frac{\frac{1}{3}(N_{LV} - \bar{Y}_c)}{\bar{Y}_c^3} = \frac{K_c^2}{(N_{LV})^2} \quad (V.12)$$

$$Q = \left(\frac{K}{(N_{LV})^2} \right)^{\frac{1}{3}(N_{LV} - \bar{Y}_c)} \cdot Q_c^{N_{LV}} \cdot \frac{1}{\bar{Y}_c! \cdot [\frac{1}{3}(N_{LV} - \bar{Y}_c)]!} \quad (V.13)$$

Die Differentiation von $\ln Q$ nach $\ln s$ enthält nur die Ableitung von K , da die Zustandssumme wegen der Maximumsbedingung nicht von der in $\bar{Y}_0$ induzierten Änderung abhängt:

$$\left. \frac{\partial \ln Q}{\partial \ln Y_c} \right|_{Y_c = \bar{Y}_c} = 0 \quad (V.14)$$

Formel (III.12) führt damit direkt auf Gleichung (10), wenn man beachtet, daß im vorliegenden System maximal $(3N-1) \cdot \frac{1}{3} N_{LV}$ Wasserstoffbrücken ausgebildet werden können.

Es sei noch auf eine Voraussetzung hingewiesen, die allen diesen Ansätzen zugrunde liegt. Das Meßsignal ist nur dann proportional zur Zahl i der Wasserstoffbrücken, wenn die Helixenden ohne Einfluß bleiben. Wie sich in der folgenden Behandlung herausstellen wird, ist diese Einschränkung nicht sehr kritisch, da die Spezies mit geringer Helixlänge nur in verschwindender Anzahl vorliegen: dem konstanten Randeffect steht also eine nur wenig schwankende Helixlänge gegenüber.

V. B. Thermodynamik der "Staggering-Zipper"-Modelle

V. B. 1. Der "AON-Stern"

Zunächst werden alle Reaktionen im Sternschema (1) als AON-Gleichgewichte betrachtet, d.h., die Zwischen-

stufen auf jedem Reaktionsstrahl werden vernachlässigt.

Im allgemeinen kann eine vorgegebene Helixlänge durch verschiedene Relativverschiebungen der Ketten erzielt werden, so daß die Gleichgewichtskonstanten $\sigma c^2 s^r$ noch mit statistischen Faktoren g_r multipliziert werden müssen. Die Vertauschbarkeit der Ketten untereinander wird bei der Abzählung nicht berücksichtigt, da sie allen Trimeren gemeinsam ist.

Das Bildungsgesetz für die g_r kann aus Abb. 4 gesehen werden. In dem Spezialfall für $N=4$ sind die Beset-



Abb. 4:

Zur Abzählung der fixierten Tripeptide bei relativer Versetzung der Einzelstränge in der Tripelhelix.

zungszahlen

r	3	4	5	6	7	8	9	10	11
g_r	3	0	3	2	0	2	1	0	1

($r=2$ liegt unter der Keimgröße und bleibt daher unberücksichtigt).

Allgemein gilt bei Verwendung einer anderen Abzählung $\{\nu, \mu\}$ an Stelle von r :

$$g_r = g_{\nu, \mu} = \begin{cases} N-\nu, & \mu=0, 2 \\ 0 & ; \mu=1 \end{cases}, \text{ wobei} \quad (\text{V.15})$$

$$(a) \quad r = 3\nu + \mu \quad \text{mit} \quad (\text{V.16})$$

$$(b) \quad \nu = 1, \dots, N-1 \quad \text{und} \quad \mu = 0, 1, 2.$$

Die Gleichgewichtskonstante des gesamten Reaktionsschemas lautet jetzt

$$K_C^2 = \sum_{r=3}^{3N-1} K_r c^2 = \sum_{\nu=1}^{N-1} (N-\nu) \partial c^2 s^{3\nu} (1+s^2) \quad (\text{V.17a})$$

Sie kann unter Verwendung der Kurzform für geometrische Reihen und ihre Ableitungen in die Form

$$K_C^2 = \partial c^2 \cdot \frac{(1+s^2)}{(s^3-1)^2} \cdot \left[s^{3N+3} - N s^6 + (N-1) s^3 \right] \quad (\text{V.17b})$$

gebracht werden.

Abbildung 5 zeigt, daß die durch (17) beschriebenen Umwandlungskurven flacher verlaufen als diejenigen des AON-Modells (IV.2). Für hohe s besitzen die Spezies knapp unter der maximalen Bindungszahl $3N-1$ ebenfalls eine hohe

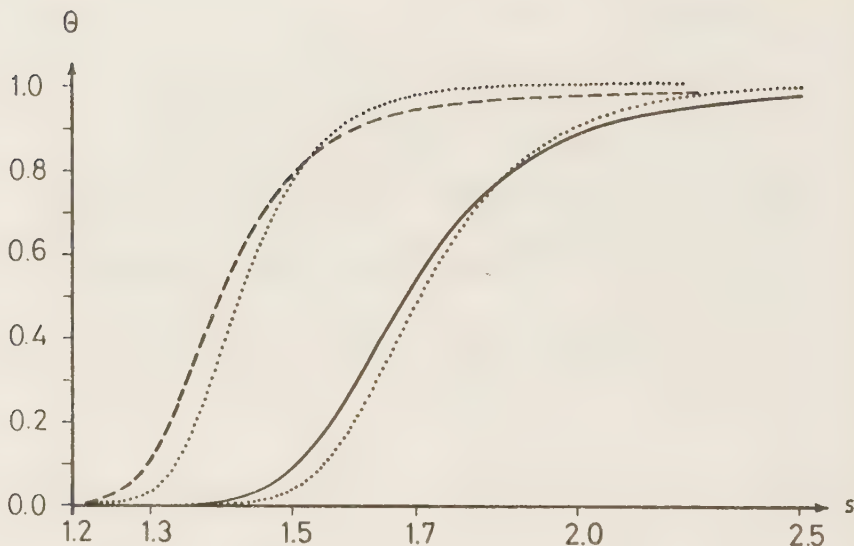


Abb. 5: Umwandlungskurven des AON-Sterns

Kooperativität: $\sigma c^2 = 10^{-8}$;

Kettenlängen: — : $N = 12$; ---- : $N = 18$;

Zum Vergleich sind die entsprechenden Kurven des AON-Modells eingetragen:

Stabilität; ihre Konkurrenz wirkt sich vermindern auf die Gesamtzahl der Wasserstoffbrücken aus. Bei kleinen s dagegen ist die Kopplung der einzelnen Reaktionsstrahlen wegen des hohen Angebots an Coil-Strängen nur gering, so daß sich die Wasserstoffbrücken verschiedener Reaktionszweige zu einem gegenüber dem AON-Verhalten höheren Umwandlungsgrad summieren.

Die Häufigkeit der einzelnen Spezies wurde für verschiedene Parameter aus (7a) berechnet, nachdem zuvor y_0 aus (7b) und (17) ermittelt worden war. Abbildung 6 gibt die Population $y_r(r)$ für die Kettenlänge $N=12$ und die Kooperativität $\sigma c^2=10^{-8}$ bei denjenigen Werten von s

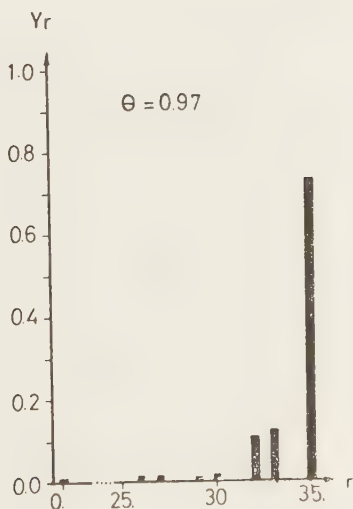
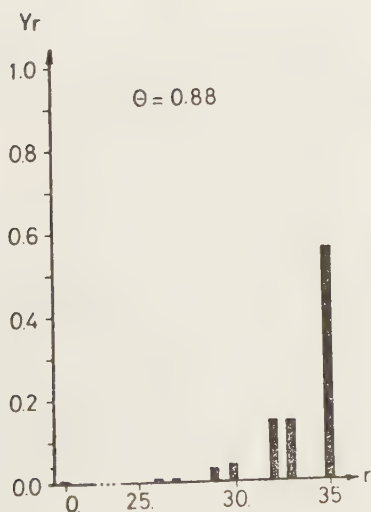
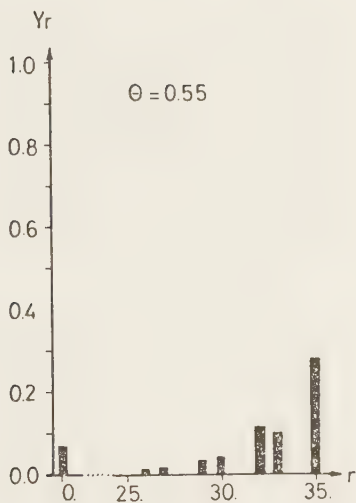
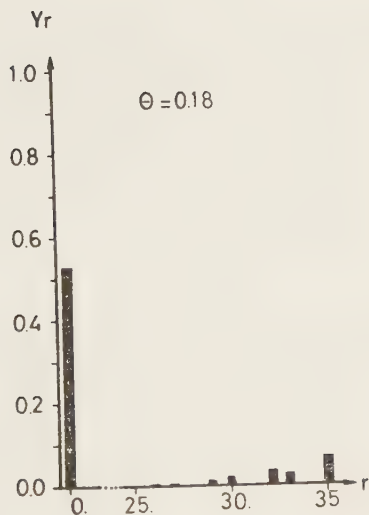


Abb. 6:

Populationen für unterschiedliche Umwandlungsgrade der kurve zu $N=12$ nach Abb. 5. Bei gleichen s-Werten ergäbe das AON-Modell die Umwandlungsgrade $\Theta = 0,1$; $0,5$; $0,9$ und $0,99$.

wider, für welche die Umwandlungsgrade im AON-Modell 0,1; 0,5; 0,9 und 0,99 betragen. Im ersten Diagramm erreicht y_{35} fast den Wert 0,1; bei höheren Umwandlungsgraden bleibt es deutlich unter dem AON-Vergleichswert. y_0 fällt mit wachsendem θ rasch ab, so daß ein Anwachsen von y_{35} schließlich nur noch durch die geringen Stabilitätsunterschiede zu den anderen Helixspezies ermöglicht wird.

Ausführliche Berechnungen für verschiedene Parameter zeigen, daß die Population umso eher dem AON-Verhalten entspricht, je geringer die Kettenlänge und je höher die Kooperativität sind: in beiden Fällen sind die s -Werte im Umwandlungsbereich höher, so daß der Abfall in der Stabilität der Spezies mit $r < 3N-1$ stärker in Erscheinung tritt.

V. B. 2. Der "mehrstufige Stern"

Ebenso, wie für den einfachen Fall des "non-staggering-zipper"-Modells das AON-Verhalten nur einen Grenzfall darstellt ^{43,44}, erscheint es auch beim Sternschema realistischer, daß die Zwischenstufen jedes Reaktionsstrahles auch im Gleichgewicht vertreten sind. Die neuen statistischen Gewichte - sie seien mit f_r bezeichnet - werden durch Abzählen aller möglichen Zwischenstufen eines jeden Reaktionsstrahles und Summierung über alle diese Strahlen ermittelt. Auch die direkte Abzählung aller Möglichkeiten führt zum Ergebnis

$$f_r = f_{r,\mu} = (N-\nu+1)^{2-\mu} \cdot (N-\nu)^{1+\mu} \quad (\text{V.18})$$

wobei wiederum Gleichung (16) die Zählung $\{\nu, \mu\}$ mit der Zahl r der Wasserstoffbrücken verknüpft.

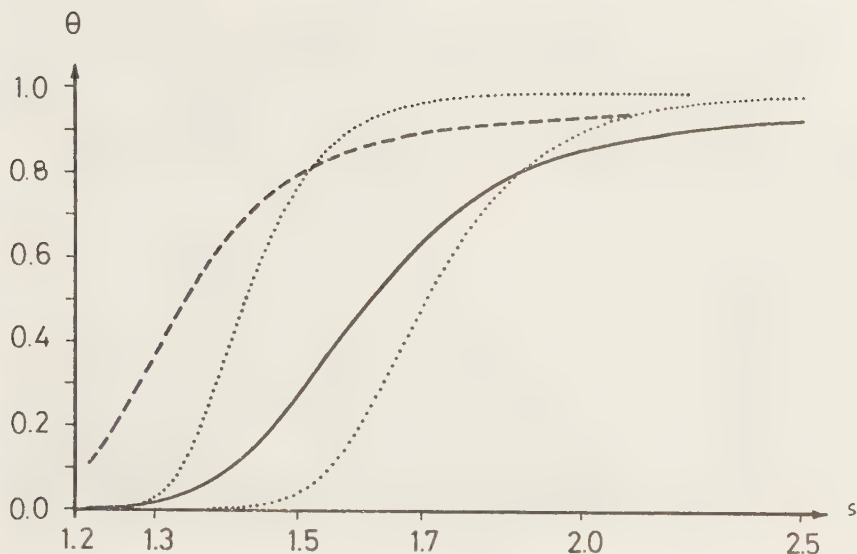


Abb. 7: Umwandlungskurven des mehrstufigen Sterns
 Kooperativität: $dc^2 = 10^{-8}$;
 Kettenlängen: — : $N = 12$; ---- : $N = 18$;
 Zum Vergleich sind die entsprechenden Kurven des
 AON-Modells eingetragen:

Wie aus Abb. 7 hervorgeht, ergibt die zum vorigen Abschnitt analoge Behandlung deutlich flachere Umwandlungskurven. Die Populationen (Abb. 8) zeigen gegenüber dem AON-Stern eine Verschiebung von der maximalen Helixlänge $3N-1$ weg, die durch die größeren statistischen Faktoren f_r hervorgerufen wird. Sie stellt die Ursache für die gegenüber dem AON-Stern größere Abweichung zum Umwandlungsgrad des AON-Modells dar. kurze Helices sind aber auch in diesem Modell zu instabil, als daß sie zum Umwandlungsgrad beitragen würden.

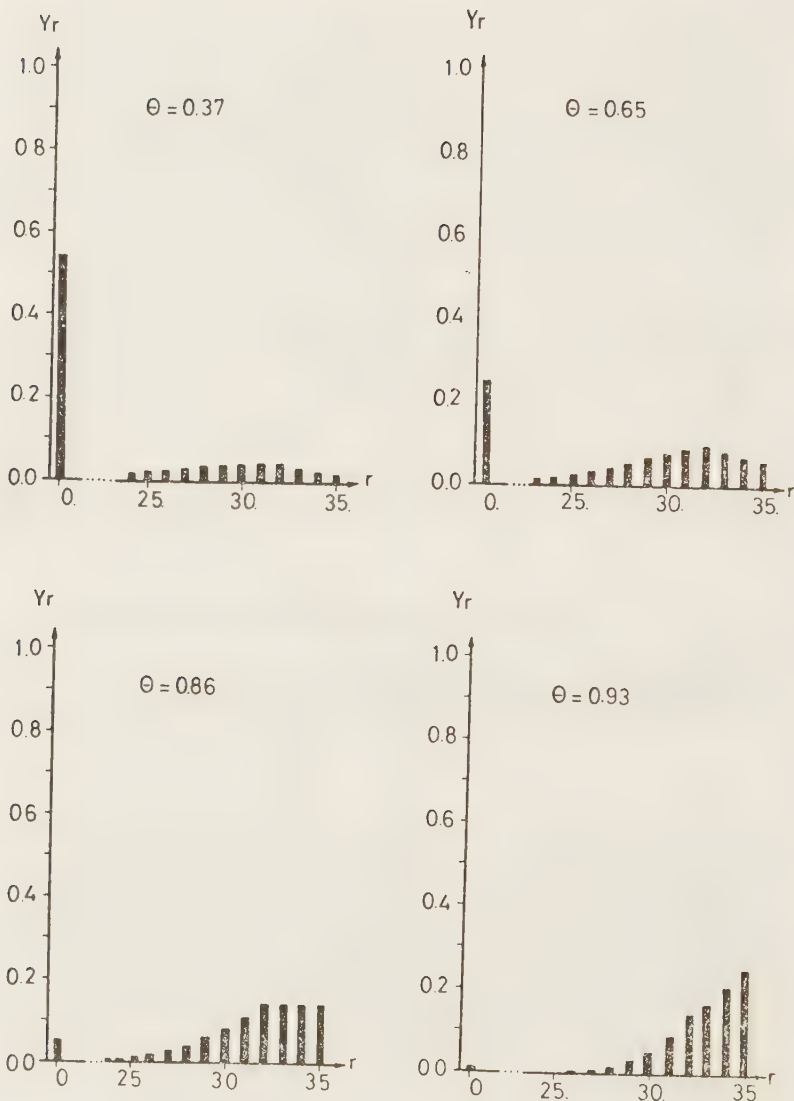


Abb. 8:

Population für verschiedene Umwandlungsgrade der kurve zu $N=12$ nach Abb. 7. Bei gleichen s -Werten ergäbe das AON-Modell die Umwandlungsgrade $\theta = 0,1; 0,5; 0,9$ und $0,99$.

V. B. 3. Bestimmung von Reaktionsenthalpien aus den Umwandlungskurven

Im Fall einer einfachen chemischen Reaktion verbindet die van't-Hoff-Gleichung

$$\frac{\partial \ln K}{\partial 1/T} = - \frac{\Delta H}{R} \quad (V.19)$$

die thermodynamische Gleichgewichtskonstante K mit der - näherungsweise als temperaturunabhängig betrachteten - Umwandlungsenthalpie ΔH . Aus der Steigung der AON-Umwandlungskurven mißt man nach (IV.9) die zur Konstanten K gehörende "gesamte Umwandlungsenthalpie" ΔH_K . Bei kalorimetrischen Messungen ^{61,62}) wird die gemessene Enthalpie oft auf ein Segment bezogen: die Enthalpie ΔH_s des Elementarschrittes entspricht - bei temperaturunabhängigem s - der Propagationskonstanten s : im Fall des AON-Modells gilt wegen $K = s^{3N-1}$ die Beziehung $\Delta H_K = (3N-1) \Delta H_s$.

Im Sternschema besteht K aus einer Summe über verschiedene Potenzen von s , so daß $\ln K$ keine lineare Funktion von $1/T$ mehr ist. Die van't-Hoff-Beziehung kann nur für die elementare Gleichgewichtskonstante s gefordert werden; ΔH_s ist jetzt weder aus den Umwandlungskurven noch aus kalorimetrischen Messungen zugänglich.

Interpretiert man ein dem Sternschema gehorchendes System über die makroskopische Gleichgewichtskonstante K , so erscheint $\ln K$ als Funktion von $1/T$ trotz der Summe annähernd linear (Abb. 9, oberste Kurve; $1/T$ kann wegen der van't-Hoff-Gleichung für s durch $\ln s$ ersetzt werden). Bezieht man aber jetzt auf die Tripeptid-Einheit, so fällt die Enthalpie $\Delta H_K / (3N-1)$ etwas kleiner als ΔH_s aus, da nicht alle Helices $3N-1$ Wasserstoffbrücken besitzen. Der Fehler wird noch verstärkt, wenn man K aus dem

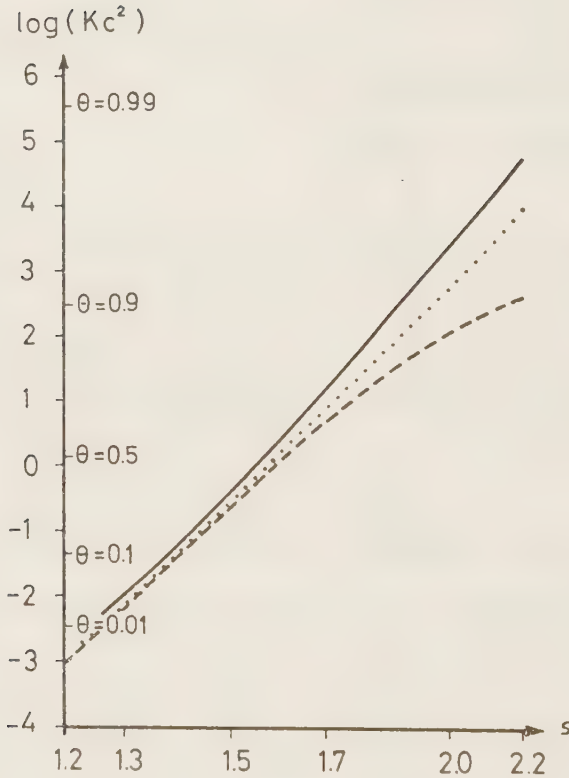


Abb. 9: Abhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten K von $1/T$ (bzw. $\ln s$) am Beispiel des mehrstufigen Sterns ($N=12$; $\delta c^2=10^{-8}$)

- : wahre Gleichgewichtskonstante Kc^2
 --- : $\theta/3(1-\theta)^3$
 : $\theta/3(1-\theta)^3$, wie man es aus Experimenten ablesen würde

Umwandlungsgrad nach der nur im AON-Modell gültigen Formel (IV.5) $Kc^2 = \theta/3(1-\theta)^3$ bestimmt (Abb. 9, unterste Kurve). Die Werte für K und die Steigung von $\ln K$ über $1/T$ fallen selbst dann zu klein aus, wenn man wegen der Unmeßbarkeit der Sättigungsgrenze ($\theta=1$; Abb. 5 und 7) die Umwandlungskurven ganz nach dem AON-Modell interpretiert und daher zu hohe θ -Werte abliest (Abb. 9, mittlere Kurve).

Die in Kapitel VII näher zu beschreibende Auswertung der Meßergebnisse basiert wegen dieser Schwierigkeit auf einer numerischen Optimierung: für verschiedene Temperaturen werden - unter Beachtung der van't-Hoff-Beziehung - optimale s-Werte zur Beschreibung der Umwandlungskurven gesucht. ΔH_s ist dann direktes Ergebnis der numerischen Anpassung.

V. C. Relaxationskinetik bei gleicher Nukleationsgeschwindigkeit in allen Strahlen ("einstufiger AON-Stern")

Die Behandlung der Kinetik im Sternschema (1) beruht auf der Vorstellung, daß Umwandlungen zwischen verschiedenen Helixspezies B_r nicht durch direktes Verschleiben der Ketten gegeneinander erfolgen können. Zu einer solchen Verschiebung müßte eine Anzahl von Brücken aufbrechen, um die Bildung eines neuen Keimes zu ermöglichen. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines zweiten Keimes ist wegen der zusätzlichen Nukleationskonstanten ($\sigma_{st} s^3$ für die Keimbildung bei sich berührenden Ketten, s. Kap. VI) zu gering, als daß er realisiert würde, bevor die ursprüngliche Helix "heilt" oder sich wegen der geringen Stabilität (s. Populationen, Abb. 6 und 8) ganz

auflöst. Es darf also angenommen werden, daß der Knäuelzustand die einzige Kopplung zwischen den einzelnen Reaktionsstrahlen darstellt.

Alle zu besprechenden Kinetikmodelle setzen voraus, daß die Nukleation nach (IV.38)

$$k_n = \sigma s^2 k \quad (\text{V.20})$$

die Geschwindigkeit des Helixaufbaus bestimmt, so daß man für jeden Reaktionsstrahl die Steady-State-Annahme machen kann. Dies impliziert sofort, daß die im Gleichgewicht vorhandenen Zwischenstufen (mehrstufiger Stern, Abschn. B.2) bei der Behandlung der Kinetik vernachlässigt werden: ihre Änderungen werden bei kleinen Auslenkungen aus dem Gleichgewicht als gering angesehen, was bei einem Vergleich der Populationen (Abb. 6 und 8) gerechtfertigt erscheint.

In erster Näherung wird zunächst gefordert, daß die Keimbildung gegenüber der Weiterreaktion zur vollständigen Helix so sehr verlangsamt ist, daß die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion durch k_n approximiert werden kann. Da diese Näherung in Kap. IV.C.1 (S. 35) für den Fall $s \gg 1$ abgeleitet wurde, ist sie nur für kurze Ketten zulässig.

V. C. 1. Mittlere Relaxationszeit

Die mittlere (reziproke) Relaxationszeit $1/\tau^*$ wird nach Schwarz^{26,27)} aus der Anfangssteigung der Relaxationskurve gewonnen. Mit der Definition (6) von Θ geht Gleichung (III.25) über in

$$\frac{1}{\tau^*} = \frac{1}{\sigma \Theta} \cdot \frac{1}{(3N-1)} \sum_{r=3}^{3N-1} r \cdot \dot{y}_r \bigg|_{t=0} \quad (\text{V.21})$$

$\dot{y}_r = dy_r/dt$ wird nun für jede Einzelreaktion aus dem AON-Modell (IV.11) ohne Linearisierung übernommen und gibt mit $\vec{K}_r = K_{r1}$

$$\begin{aligned} \frac{1}{\tau^* k_n c^2} &= \frac{1}{(3N-1)\delta\theta} \sum_{r=3}^{3N-1} r \cdot \left(3\bar{y}_0^3 - \frac{1}{\bar{K}_r c^2} \bar{y}_r \right) \\ &= \frac{3\bar{y}_0^3}{(3N-1)\delta\theta} \sum_{r=3}^{3N-1} r \cdot \left(1 - \frac{\bar{K}_r}{\bar{K}_r} \right) \end{aligned} \quad (V.22)$$

(Die gestrichenen Größen beziehen sich auf den neuen Gleichgewichtszustand, die Anfangsbedingungen für die Zeit $t=0$ sind durch eine hochgestellte Null gekennzeichnet. Die Verwendung von r als Summationsindex soll hier und in allen folgenden Rechnungen anzeigen, daß nur über diejenigen Spezies summiert werden darf, für die K_r nicht verschwindet, für die also $\mu \neq 1$ gilt.).

Setzt man die Grundformel (10) für θ in die Definition (III.22) von $\delta\theta$ ein, so erhält man aus (22) den Ausdruck

$$\frac{1}{\tau^* k_n c^2} = \frac{1}{\left[\left(\frac{\bar{y}_0}{\bar{y}_c} \right)^3 \bar{K}' c^2 - \bar{K} c^2 \right]} \sum_{r=3}^{3N-1} r \cdot \left(1 - \frac{\bar{K}_r}{\bar{K}_r} \right), \quad (V.23)$$

der noch - unter den durch das spezielle Modell geforderten Einschränkungen - allgemein für beliebige Störungen des Gleichgewichts gilt.

Für kleine Sprünge läßt sich die Summe weiter vereinfachen, wenn man $\bar{y} = \bar{y} - \delta y$ in $\bar{K}_r$ von Gleichung (17a) einsetzt und den Quotienten nach Potenzen von $\delta y/\bar{y}$ entwickelt:

$$\frac{\bar{K}_r}{\bar{K}_r} = \left(1 - \frac{\delta y}{\bar{y}} \right)^r \approx e^{-r \frac{\delta y}{\bar{y}}} \approx 1 - r \cdot \frac{\delta y}{\bar{y}} \quad (V.24)$$

(Die letzte Näherung verlangt $r \frac{\delta y}{\bar{y}} \ll 1$)

Die nach Ausklammern von $\delta_s/\bar{s}$ in (23) verbleibende eingeschränkte Summe über r^2 wird mit Hilfe von (16) in eine Summe über ν umgewandelt und ergibt

$$\sum_{r=3}^{3N-1} r^2 = \sum_{\nu=1}^{N-1} \left\{ (3\nu)^2 + (3\nu+2)^2 \right\} = (N-1)(N^2+3N+4) \quad ; \quad (V.25)$$

so daß (23) übergeht in

$$\frac{1}{\tau^* h_n c^2} = \frac{\delta_s}{5} (N-1)(N^2+3N+4) \cdot \left[\left(\frac{\bar{y}}{\bar{y}_0} \right)^3 \bar{s} \bar{K}'^2 - \bar{s} \bar{K}'^2 \right]^{-1} \quad . \quad (V.26)$$

Bei unendlich kleiner Sprungamplitude darf die mittlere Relaxationszeit nicht mehr vom Ausgangszustand bzw. von der Sprunghöhe δ_s abhängen. Tatsächlich läßt sich letztere durch die weitere Linearisierung

$$\delta\theta = \frac{d\theta}{ds} \delta_s \quad (V.27)$$

auch aus dem Nenner ausklammern, wenn man Gleichung (22) mit Hilfe von (24) und (25) umschreibt zu

$$\frac{1}{\tau^* h_n c^2} = \frac{3 \bar{y}_0^3}{(3N-1) \bar{\theta}} \cdot \frac{\delta_s}{5} (N-1)(N^2+3N+4) \quad . \quad (V.28)$$

Bringt man Gleichung (10) unter Verwendung von (7) in die Form

$$(3N-1) \bar{\theta} = 3 \bar{y}_0^3 \bar{s} \bar{K}'^2 \quad (V.29)$$

so findet man

$$(3N-1) \bar{s} \cdot \frac{d\bar{\theta}}{ds} \delta_s = \left[9 \bar{y}_0^3 \bar{s} \left(\bar{s} \bar{K}'^2 \right) \frac{d\bar{y}_0}{ds} + 3 \bar{y}_0^3 \bar{s} \left(\bar{s} \bar{K}'^2 \right)' \right] \delta_s \quad . \quad (V.30)$$

dy_0/ds wird durch Differenzieren von $3\bar{y}_c^3 \bar{K}_c^2 + \bar{y}_c - 1 = 0$ (Gleichung (7b)) gewonnen:

$$\frac{dy_c}{ds} = - \frac{3\bar{y}_c^3 \bar{K}_c^2}{1 + 9\bar{y}_c^2 \bar{K}_c^2} \quad (V.31)$$

Setzt man diesen Differentialquotienten in (30) ein, so erhält man aus (28) endlich den Ausdruck

$$\frac{1}{\tau^*_{K_n}} = (N-1)(N^2 + 3N + 4) \cdot \left[\bar{s}(\bar{s}\bar{K}_c^2)' - (\bar{s}\bar{K}_c^2)^2 \frac{9\bar{y}_c^2}{1 + 9\bar{y}_c^2 \bar{K}_c^2} \right]^{-1}, \quad (V.32)$$

da für infinitesimale Sprünge $\bar{y}_0 = \bar{y}_c$ gesetzt werden darf.

Gleichung (32) verbindet die mittlere Relaxationszeit bei kleinen Änderungen der Gleichgewichtsbedingungen ausschließlich mit Größen, die durch den angestrebten Zustand bestimmt sind. Die einzige Relaxationszeit des AON-Modells ist als Sonderfall enthalten, wenn man den Zähler durch $(3N-1)^2$ ersetzt, da er ja die Summe über r^2 darstellt.

Im Unterschied zum AON-Modell enthält Gleichung (32) eine Abhängigkeit vom Polymerisationsgrad (Abb. 10). Zunächst erscheint überraschend, daß die Reaktion wegen der im wesentlichen zu N^{-3} proportionalen mittleren Relaxationszeit fast im ganzen Umwandlungsbereich umso schneller beginnt, je größer die Kettenlänge ist, so daß die AON-Reaktion die langsame Grenze darstellt*. Dieser Effekt erklärt sich aus der Population, die mehrere Wege zur Reaktion bietet, so daß für einen festen Wert von s noch weitere Reaktionen zur AON-Kinetik hinzukommen.

* Diese Feststellung gilt nur für den Anfang der Reaktion. Für den gesamten Ablauf müssen alle Relaxationszeiten betrachtet werden (Abschn. 2)

$\log(\tau^* k_n c^2)$

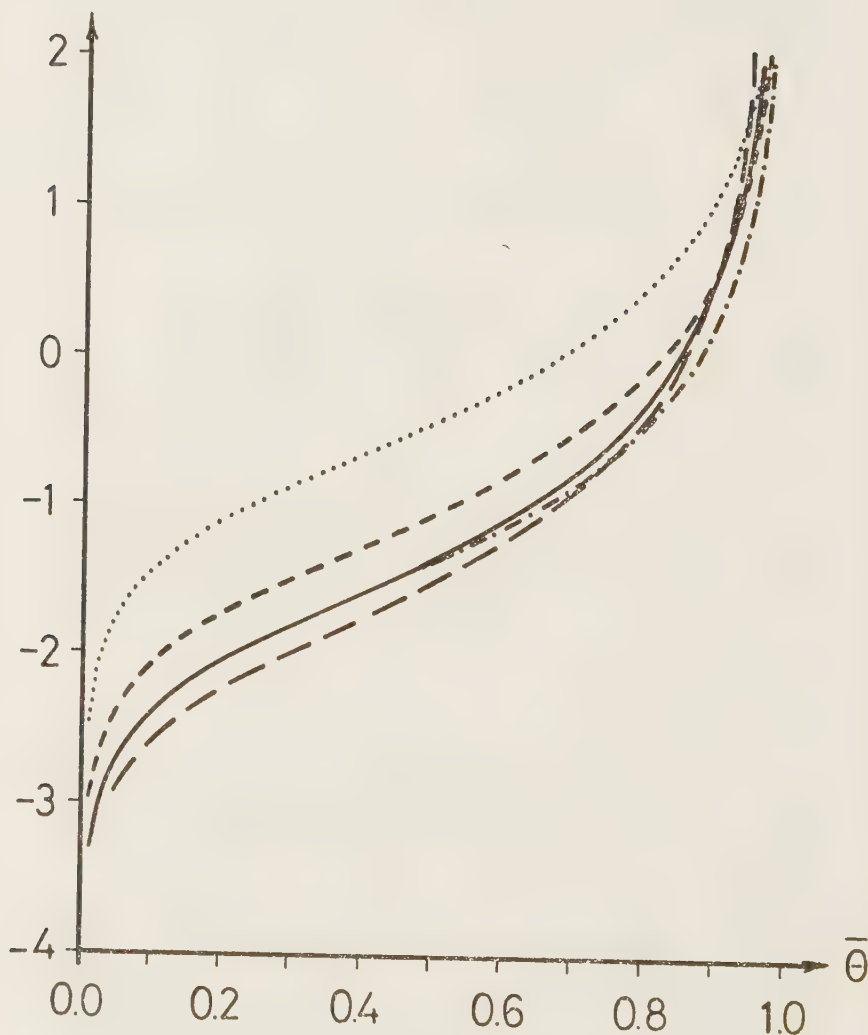


Abb. 10: Mittlere (reziproke) Relaxationszeit im einstufigen AON-Stern

Kettenlängen $N = 6$ (----); 12 (—); und 18 (---) für die Kooperativität $dc^2 = 10^{-8}$. Für $N=12$ wurde auch der Kurvenverlauf bei $dc^2 = 10^{-16}$ eingetragen (· · · · ·). Zum Vergleich: AON-Modell, Kurve von Abb. 3b (· · · · ·).

Bei kleinen $\bar{\Theta}$ wirkt sich zusätzlich die Verschiebung der Umwandlungskurven zu kleineren s-Werten (Abb. 5, S. 46) vermindern auf τ^* aus, welches nach Abb. 3 (S. 25) mit kleineren s kürzer wird (die entsprechenden Kurven des einstufigen AON-Sterns sind gegenüber Abb. 3 nur zu kürzeren Zeiten hin verschoben).

Da der Nenner von (32) nicht einfach in $\bar{\Theta}$ darstellbar ist, kommt bei der Auftragung von $\tau^* \lambda_n^2$ über $\bar{\Theta}$ noch eine Abhängigkeit von σc^2 hinzu, die in Abb. 10 nur für $N=12$ eingetragen ist. Sie wirkt sich erst bei großen Umwandlungsgraden aus, wo für kleinere Kooperativitäten die große Stabilität auch nicht-maximaler Helices die Reaktion stark verzögert.

Insgesamt gilt für die mittlere Relaxationszeit die nämliche Feststellung wie in Abschnitt B: das AON-Verhalten wird umso eher erreicht, je kleiner die Kettenlänge und je höher die Kooperativität sind.

V. C. 2. Sämtliche Relaxationszeiten

Die Messung der Anfangssteigung gibt ein einfaches, aber sehr unvollkommenes Bild vom Reaktionsablauf. Die genaue Beschreibung geschieht mit Hilfe des Relaxationsspektrums $\{\tau_r, \beta_r\}$. Seine Berechnung verlangt die Diagonalisierung des kinetischen Gleichungssystems ⁴⁶⁾, die wegen der hohen Anzahl von Gleichungen und der nicht klar zu trennenden Größenordnungen in den Besetzungszahlen der einzelnen Spezies nur mit hohem numerischen Aufwand für jeweils feste Bedingungen $\{N, \bar{s}, \sigma c^2\}$ durchführbar ist. Da andererseits die Zeiten τ_r als Eigenwerte auch im vorliegenden System relativ leicht bestimmbar sind und die Population und die mittlere Relaxationszeit

Hinweise auf die Größenordnung der β_r geben, wurde auf eine numerische Berechnung der Gewichte verzichtet.

Ausgangsgleichung zur Bestimmung der Relaxationszeiten ist die AON-Reaktion im Strahl r des Sternschemas:

$$\frac{dy_r(t)}{dt} = k_n \left[3(y_c(t))^2 - \frac{1}{K_r} y_r(t) \right] \quad (V.33)$$

Nach Übergang auf die Änderungen $\delta y_r(t) := \bar{y}_r - y_r(t)$ und Linearisierung erhält man mit der Erhaltungsgleichung (5b)

$$\frac{d\delta y_r(t)}{dt} = -k_n c^2 \left[y_c^2 \sum_{j=3}^{3N-1} \delta y_j(t) + \frac{1}{K_r c^2} \delta y_r(t) \right] \quad (V.34)$$

Die Relaxationszeiten gewinnt man nach ⁴⁶⁾

$$\tau_r = - \frac{1}{\lambda_r} \quad (V.35)$$

aus den Eigenwerten λ_r der Koeffizientenmatrix zu dem System (34) von linearen Differentialgleichungen erster Ordnung in der Zeit.

Nach Einführung der Abkürzungen

$$\begin{aligned} (a) \quad \xi &:= -9k_n c^2 \bar{y}_c^2 \\ (b) \quad \zeta_r &:= \bar{y}_c / 3 \bar{y}_r = -\frac{1}{\xi} \cdot \frac{k_n}{K_r} \\ (c) \quad \varepsilon &:= \lambda / \xi \end{aligned} \quad (V.36)$$

erhält man die Säkulargleichung zur Bestimmung der

Eigenwerte in der Form

$$\begin{vmatrix} 1+\gamma_3-\varepsilon & 1 & 1 & \dots & 1 \\ 1 & 1+\gamma_5-\varepsilon & 1 & \dots & 1 \\ 1 & 1 & 1+\gamma_6-\varepsilon & & \\ \vdots & \vdots & & \ddots & \vdots \\ 1 & 1 & \dots & & 1+\gamma_{3N-1}-\varepsilon \end{vmatrix} = 0 \quad (V.37)$$

Nach den Rechenregeln für Determinanten ändert sich das charakteristische Polynom nicht, wenn die zu (37) gehörende Matrix mit anderen Matrizen von der Determinante 1 multipliziert wird. Man kann also ⁶³⁾ von links mit (38a) multiplizieren (entspricht der Addition der letzten Zeile von (37) zur ersten) und von rechts mit (38b) (subtrahiert die erste Spalte von jeder anderen), wodurch (37) in (39) übergeht:

$$(a) \begin{pmatrix} 1 & 0 & \dots & 0 & 1 \\ 0 & 1 & 0 & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots & \vdots \\ 0 & \dots & \dots & 1 & 0 \end{pmatrix} \quad (b) \begin{pmatrix} 1 & -1 & -1 & \dots & -1 \\ 0 & 1 & 0 & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots & \vdots \\ 0 & \dots & \dots & 1 & 0 \end{pmatrix} \quad (V.38)$$

$$\begin{vmatrix} 2+\gamma_3-\varepsilon & \varepsilon-\gamma_3 & \varepsilon-\gamma_3 & \dots & \varepsilon-\gamma_3 & \gamma_{3N-1}-\gamma_3 \\ 1 & \gamma_5-\varepsilon & 0 & \dots & 0 & 0 \\ 1 & 0 & \gamma_6-\varepsilon & & & \\ \vdots & \vdots & & \ddots & & \vdots \\ 1 & 0 & \dots & & & \gamma_{3N-1}-\varepsilon \end{vmatrix} = 0 \quad (V.39)$$

Sämtliche Unterdeterminanten zur 1. Zeile können jetzt sofort angegeben werden, da oberhalb ihrer Hauptdiagonalen nur Nullen stehen. Die Entwicklung der Determinante führt auf

$$D = (2 + \gamma_3 - \varepsilon) \prod_{j=5}^{3N-1} (\gamma_j - \varepsilon) - (\varepsilon - \gamma_3) \sum_{r=5}^{3N-1} \frac{\prod_{j=5}^{3N-1} (\gamma_j - \varepsilon)}{(\gamma_r - \varepsilon)} - (\gamma_{3N-1} - \gamma_3) \frac{\prod_{j=5}^{3N-1} (\gamma_j - \varepsilon)}{(\gamma_{3N-1} - \varepsilon)} \quad (V.40)$$

wobei wieder nur über die Indizes existierender Spezies ($\mu \neq 1$) multipliziert bzw. summiert wird. Man überzeugt sich leicht, daß keines der $(\gamma_r - \varepsilon)$ verschwinden kann, weshalb (40) durch das Produkt $\prod_{j=3}^{3N-1} (\gamma_j - \varepsilon)$ geteilt werden darf*. Nach kurzer Umformung und Wiedereinsetzen der Abkürzungen (36) vereinfacht sich (40) zu

$$1 + g \bar{y}_0^{-2} \sum_{r=3}^{3N-1} \frac{1}{\frac{1}{\bar{\kappa}_r c^2} - \frac{1}{\tau k_n c^2}} = 0 \quad (V.41)$$

Formal sind hier alle Relaxationszeiten gleichwertig berücksichtigt, d.h. Gleichung (41) ändert sich nicht bei Ummummerierung der Relaxationszeiten.

Diese Gleichung kann leicht numerisch ausgewertet werden, da die linke Seite als Funktion von $\sqrt{\tau k_n c^2}$ außerhalb der Pole stets streng monoton wächst und somit zwischen je zwei Polen und rechts vom größten Pol genau eine Nullstelle besitzt. Die höchste Nullstelle ist dabei durch die kleinste Gleichgewichtskonstante bedingt und führt auf die kürzeste Relaxationszeit.

Die Computer-Auswertung wurde wie bei den Populationsberechnungen für die Kettenlängen $N = 6; 12$ und

* Gl. (40) selbst enthält keinen echten Quotienten, da die Ausdrücke des Nenners stets auch im Zähler auftreten.

N	σc^2	$\bar{\Theta}^{AON}$	$\bar{\Theta}^{*}$	$\log \tau_{\infty} \cdot h_c^2$	$\log \tau_3 \cdot h_c^2$	$\log \tau^* \cdot h_c^2$
6	10^{-8}	0,1	0,12	-1,45	- 6,15	-2,0
		0,5	0,51	-0,3	- 5,85	-1,05
		0,9	0,89	1,65	- 5,45	0,45
6	10^{-16}	0,1	0,10	-1,45	-12,7	-2,1
		0,5	0,50	-0,45	-12,45	-1,1
		0,9	0,90	1,1	-12,05	0,4
12	10^{-8}	0,01	0,03	-2,5	- 6,5	-3,0
		0,1	0,18	-1,4	- 6,4	-2,15
		0,5	0,55	-0,0	- 6,25	-1,2
		0,9	0,88	2,2	- 6,05	0,25
		0,99	0,97	5,1	- 5,8	2,4
12	10^{-16}	0,01	0,01	-2,5	-13,8	-3,3
		0,1	0,12	-1,45	-13,7	-2,3
		0,5	0,52	-0,3	-13,6	-1,35
		0,9	0,90	1,8	-13,35	0,15
		0,99	0,99	4,65	-13,1	2,2
18	10^{-8}	0,1	0,23	-1,35	- 6,4	-2,4
		0,5	0,60	0,05	- 6,3	-1,5
		0,9	0,88	2,35	- 6,2	0,0
18	10^{-16}	0,1	0,15	-1,45	-13,95	-2,15
		0,5	0,55	-0,1	-13,85	-1,25
		0,9	0,90	2,1	-13,7	0,2

Tabelle 1: Einstufiger AON-Stern

Maximale und minimale Relaxationszeiten τ_{3N-1} bzw. τ_3 sowie mittlere Relaxationszeit τ^* nach (32).

18 und die Kooperativitäten $\sigma c^2 = 10^{-8}$, 10^{-12} und 10^{-16} bei denjenigen Propagationskonstanten s durchgeführt, bei denen im AON-Modell der vollen Kettenlänge $3N-1$ die Umwandlungsgrade 0,01; 0,1; 0,5; 0,9 und 0,99 betragen. Eine Zusammenstellung der wichtigsten Ergebnisse gibt Tabelle 1.

Dieser Tabelle zufolge ist die längste Relaxationszeit $\tau_{3N-1} \cdot h_c^2$ im unteren Umwandlungsbereich nahezu unabhängig von Kettenlänge und Kooperativität: wegen der schwachen Kopplung der einzelnen Reaktionen ist der Unterschied zur zugeordneten AON-Reaktion nur gering. Das

für größere s sehr viel raschere Anwachsen ist wie bei der mittleren Relaxationszeit umso stärker ausgeprägt, je geringer die Kooperativität und je höher die Kettenlänge sind.

Die kurzen Relaxationszeiten liegen stets sehr dicht bei jenen der entkoppelten Einzelreaktionen (AON-Modell für die Kettenlängen r): die Konkurrenz wirkt sich bei der geringen thermodynamischen Wahrscheinlichkeit z.B. des Zustandes mit nur drei Wasserstoffbrücken

kaum aus: $\left. \frac{1}{\tau_3 k_n c} \right|_{\text{AON}} = \bar{y}_c^2 + \frac{1}{K_3 c^2}$ wird immer vom zweiten

Term dominiert. Man mißt mit τ_3 also vorwiegend die Geschwindigkeit $k_n/\bar{K}_3$ der Rückreaktion, weshalb die Werte von $\tau_3 k_n c^2$ im wesentlichen proportional zu $k_n c^2$ und damit wegen der Annahme (20) zu σc^2 sind.

Aus Gleichung (41) läßt sich noch eine Aussage zur Reihenfolge der einzelnen Relaxationszeiten gewinnen: da sie parallel zu den $\bar{K}_r$ angeordnet sind, wachsen sie mit der durch die Population gegebenen Verteilung der einzelnen Spezies an, denen sie im Bereich geringer Kopplung auch zugerechnet werden können. Ummummierungen bezüglich ihrer Größe treten genau dort auf, wo kleine s -Werte durch große Unterschiede in den Gewichten g_r überkompensiert werden, was nur für die "oberen" Spezies im Bereich fern der AON-Näherung möglich ist.

Schließlich sei noch auf die Lage der mittleren Relaxationszeit relativ dicht bei den längsten Relaxationszeiten hingewiesen. Nur für große $\bar{\theta}$, wo letztere stark auseinanderweichen, treten größere Abweichungen auf. Daraus erkennt man sofort, daß die kurzen Relaxationszeiten nur verschwindende Gewichte erhalten, da sie sonst die Summe (III.24) (S. 15) in $1/\tau^*$ dominieren würden. Da mathematisch alle Reaktionszweige gleichwer-

tig sind (Gleichung (41)), müssen die β_r im wesentlichen monoton mit der Population (bzw. mit den zugehörigen Relaxationszeiten τ_r) ansteigen. Auf Grund dieser Überlegung wurde die Summe (III.24) für verschiedene analytische Ausdrücke an Stelle der β_r berechnet und mit dem aus der Anfangssteigung ermittelten Wert (32) von $1/\tau^*$ verglichen. Die Ansätze für β_r beschränkten sich dabei auf Kombinationen von r , $\bar{K}_r c^2$ und der reziproken Differenz

$$\frac{1}{\left(\frac{1}{\tau_r}\right)_{\text{ADN}} - \frac{1}{\tau_{3N-1}}} \quad . \quad (\text{V.42})$$

Diese letzte Form (42) erzielte dabei als einzige eine gute Übereinstimmung im ganzen Umwandlungsbereich und weitgehend unabhängig von Kettenlänge und Kooperativität. Trotz der Schwankungsbreite von $\tau^* h_p c^2$ um über fünf Größenordnungen - bei Variation der einzelnen Relaxationszeiten zwischen 15 Zehnerpotenzen - betrugen die logarithmischen Abweichungen selten über 0,5. Da (42) aber nicht durch Diagonalisierung des kinetischen Gleichungssystems gewonnen wurde, kann es nur als Hinweis auf eine mögliche Verteilung der Relaxationsgewichte betrachtet werden.

V. C. 3. Verhalten bei nicht-infinitesimalen Gleichgewichtsänderungen

Die Relaxationszeiten sind Funktionen der Koeffizientenmatrix, welche nur Größen des angestrebten Gleichgewichtszustandes enthält. Die Relaxationsgewichte sind darüber hinaus auch Funktionen der Anfangsbedingungen ²⁶⁾, so daß die mittlere Relaxationszeit bei realen Sprungamplituden ebenfalls von diesen abhängt, weshalb sich Gleichung (32) (S. 57) nur unter der Voraussetzung in-

finitesimaler Gleichgewichtsänderungen gewinnen ließ.

Ein Vergleich der theoretischen Umwandlungskurven mit den Gleichgewichtsmessungen (Kap. VII.C.1) zeigt, daß für realistische Sprunghöhen $|\delta s/\bar{s}| = |\delta \ln \tau| \approx 0,05$ anzusetzen ist. Um den Einfluß der für (32) nötigen Approximation abschätzen zu können, wurde diese Größe in die Identität der Gleichung (24) eingesetzt und damit Form (23) der mittleren Relaxationszeit bei Vorgabe von $\bar{s}$ ausgewertet. Ein Beispiel für den Verlauf von $\log(\tau^* k_{nc}^2)$ geben Abb. 11 a und b, in die zum Vergleich auch die idealen Kurven von Gleichung (32) eingetragen wurden. Nach dieser Abbildung ist für Sprünge zu tieferem $\bar{\theta}$ ("Abwärtssprünge" von (!) der tieferen Temperatur) ein um den Faktor 2 bis 3 langsamerer Reaktionsbeginn zu erwarten als beim Aufwärtssprung zur gleichen Temperatur. Dieses Ergebnis wurde von den Messungen am CB2 bestätigt.

Obwohl bei hohen Umwandlungsgraden nur wenig Coil-Moleküle an der Reaktion beteiligt sein können (s. Populationen Abb. 6, S. 47), versagt die Linearisierung der kinetischen Gleichungen gerade in diesem Bereich (Abb. 11). Zur Begründung dieser Erscheinung werden im folgenden die beiden in Abschnitt C.1 vorgenommenen Linearisierungen getrennt untersucht, wobei sich herausstellen wird, daß die auftretenden Abweichungen eine allgemeine Eigenschaft der Relaxationskinetik sind.

Während bei der üblichen Berechnung des Relaxationsspektrums ⁴⁶⁾ die Konzentrationen zur Zeit $t=0$ sofort durch ihre Abweichungen vom Endwert ausgedrückt werden, mußte in C.1 die Einführung eben dieser Konzentrationsdifferenzen vermieden werden, um trotz Kopplung und gleichzeitiger Summierung (6) zu $\delta \theta$ eine übersichtliche Formulierung zu ermöglichen. Die erste Näherung trat mit der Entwicklung von $\overset{0}{K}_R/\bar{K}_R$ nach $\delta s/\bar{s}$ auf, die wegen der

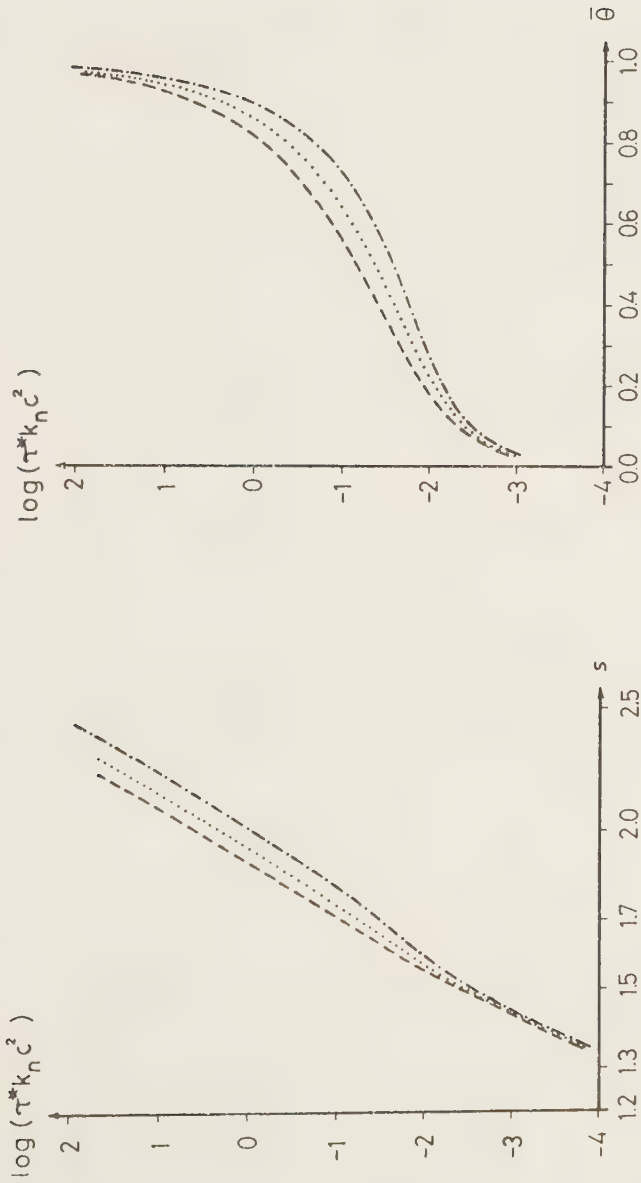


Abb. 11: Mittlere Relaxationszeiten des einstufigen AON-Sterns bei
endlichen Gleichgewichtsstörungen ($N=12$; $dc^2=10^{-8}$)

--- : Aufwärtssprünge $\delta \ln s = +0,05$; -.-.- : Abwärtssprünge $\delta \ln s = -0,05$;
..... : ideales Verhalten nach Gleichung (32)

a) $\log(\tau^* k_n c^2) / \ln s$ (bzw. $1/T$) b) $\log(\tau^* k_n c^2) / \bar{\theta}$

Konstanz von $\delta \ln s$ im ganzen Umwandlungsbereich den gleichen Fehler liefert. Die Folge ist ein paralleles Auseinanderrücken der Kurven von Auf- und Abwärtssprung, doch muß dieser Effekt Abb. 11 zufolge klein sein.

Das Auseinanderklaffen der beiden Kurven bei grossen $\bar{\theta}$ kann also nur eine Folge der zweiten, in der Relaxationskinetik üblichen Vernachlässigung von Termen höherer Ordnung in den Konzentrationsänderungen sein (Gleichung (27) in der Form $\delta s = \frac{ds}{d\theta} \delta \theta$). Daß hierdurch der größte Fehler im Bereich der Trimeren gemacht wird, sei kurz am Beispiel der AON-Reaktion $3A \rightleftharpoons B$ erläutert, wo $\theta = y$ gilt. Die Kinetikgleichung (IV.11) ergibt mit $y = \bar{y} - \delta y$; $y_0 = \bar{y}_0 - \delta y_0$ und $\delta y_0 = -\delta y$

$$-\frac{d\delta y}{dt} = \bar{k}c^2 \left[\frac{3\bar{y}_0^3}{\bar{c}_y^3} + g_{\bar{y}_c}^{-2} + g_{\bar{y}_c} \delta y + 3(\delta y)^2 - \frac{1}{\bar{k}c^2} \frac{\bar{y}}{\bar{c}_y} + \frac{1}{\bar{k}c^2} \right] \cdot \delta y, \quad (V.43)$$

wo sich die durchgestrichenen Terme wegen der Gleichgewichtsbedingung (IV.4a) herausheben. Zur Integration von (43) müssen nun die Summanden mit δy innerhalb der eckigen Klammer vernachlässigt werden, was unter zwei Bedingungen berechtigt ist:

- 1) $g_{\bar{y}_c}^{-2} \gg g_{\bar{y}_c} \delta y$ oder $\frac{\delta y}{\bar{y}_c} \ll 1$ für $g_{\bar{y}_c}^{-2} > \frac{1}{\bar{k}c^2}$
- 2) $\frac{1}{\bar{k}c^2} \gg g_{\bar{y}_c} \delta y$ für $\frac{1}{\bar{k}c^2} \geq g_{\bar{y}_c}^{-2}$ oder wegen (IV.4a) $\bar{y}_c / 3\bar{y} \geq 1$

Beide Bedingungen fordern aber das gleiche: $\delta y / \bar{y}_c \ll 1$ ist bei meßbaren (und damit limitierten) Veränderungen δy_0 am besten im Coildbereich mit großem $\bar{y}_0$ erfüllt, welcher von Bedingung 2 direkt gefordert wird. Die Qualität der Linearisierung beruht also nicht auf der Vernachlässigbarkeit der Monomeren-Konzentration gegen jene an Trimeren, sondern auf einer geringen relativen Änderung des Monomeren-Anteils durch die Reaktion.

V. D. Relaxationskinetik bei unterschiedlichen Bildungs-
geschwindigkeiten der einzelnen Spezies: $\vec{k}_r = \vec{k}_r(r)$

Die wesentlichen kinetischen Eigenschaften des Sternschemas wurden im letzten Abschnitt am einfachsten Beispiel aufgezeigt, das durch den Grenzfall $\vec{k}_r = k_n$ für alle Zweige r bestimmt war. Für die Auswertung von Messungen stellt diese Annahme eine starke Einschränkung dar, deren Auswirkungen durch analoge Behandlung einiger weiterer Modelle untersucht wurden, von denen hier die wichtigsten skizziert werden. Die prinzipiellen Aussagen bleiben erhalten; Verschiebungen ergeben sich hinsichtlich der Abhängigkeit von der Kettenlänge und - in wesentlich geringerem Ausmaß - von der Kooperativität.

V. D. 1. Die Reaktionsgeschwindigkeit $\vec{k}_r$ hängt nur von
Potenzen von r ab: $\vec{k}_r = k_n \cdot r^\alpha$

Die Voraussetzung für das Modell des einstufigen AON-Sternes wurde mit dem einen Grenzverhalten (IV.41) der Steady-State-Reaktion (IV.37) begründet. Betrachtet man das andere Extrem von (IV.41) für $\vec{k}_r$ in der geringfügig veränderten Form

$$\vec{k}_r = \frac{1}{r} k_n \quad , \quad (V, 44)$$

so fällt ein Faktor r in den Summanden von (23) fort. Die an Stelle von (25) entstehende eingeschränkte Summe über r erhält damit den Wert $(N-1) \cdot (3N+2)$. Da keine das Gleichgewicht im AON-Stern berührenden Änderungen vorgenommen wurden, verläuft $\tau^{k_n c^2}$ jetzt parallel zu den durch Gleichung (32) beschriebenen Kurven. Ihre Abhängigkeit von N ist geringer geworden, die Relaxationszeit-

ten sind entsprechend der Senkung aller Geschwindigkeiten länger.

Die beiden Fälle $\vec{k}_r = k_n$ und $\vec{k}_r = k_n/r$ berücksichtigen nicht die durch die Versetzung der Stränge gegebenen statistischen Faktoren ε_r . Da sich die erhöhte Zahl von Reaktionsmöglichkeiten auf die Geschwindigkeit auswirken sollte, wurden auch die Fälle

$$\begin{aligned} (a) \quad \vec{k}_r &= g_r \cdot k_n & \text{und} \\ (b) \quad \vec{k}_r &= \frac{g_r}{r} \cdot k_n \end{aligned} \quad (V.45)$$

betrachtet. Die Einführung der Gewichte (15) ändert wegen (16) im wesentlichen wieder nur die Potenz von r unter der Summe, die sich jetzt zu $1/2 \cdot N(N-1)(3N^2+7N+8)$ bzw. $N(N-1)(N+2)$ berechnet. Im letzteren Fall geht N also wie in (32) mit der dritten Potenz ein, da g_r linear vom Polymerisationsgrad abhängt.

V. D. 2. Zusammensetzung der Kinetik aus Steady-State-Reaktionen: "einfacher" und "allgemeiner Steady-State-Stern"

Geringfügig flacher als die bisher untersuchten Kurven verläuft $\log(\tau^*_{k_n} c^2)$ über $\bar{\theta}$, wenn man für jeden Reaktionsstrahl das Steady-State-Verhalten (IV.39) explizit einsetzt. Die der Gleichung (25) entsprechende Summe wird jetzt eine Funktion von s und läßt sich nicht mehr analytisch zusammenfassen. Die mittlere Relaxationszeit für den "einfachen Steady-State-Stern" wurde deshalb numerisch aus der Form (46) berechnet:

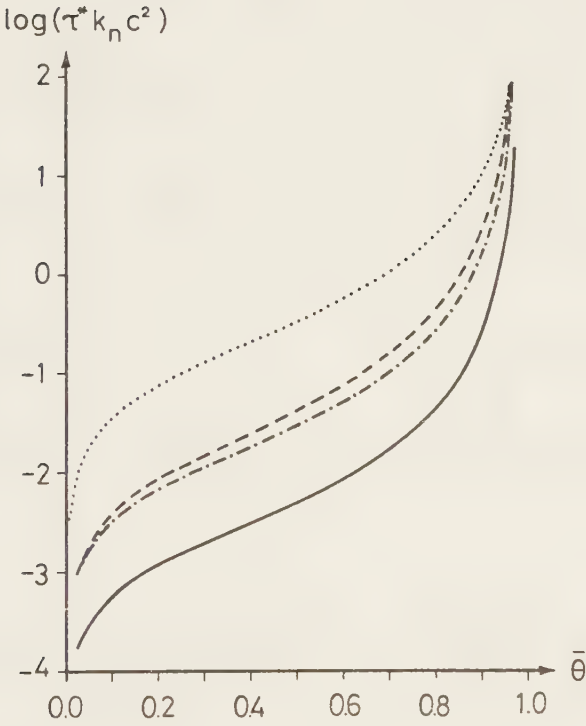


Abb. 12:

Mittlere Relaxationszeiten $\tau^* k_n c^2$ im einfachen (---) und im allgemeinen (—) Steady-State-Stern für $N=12$ und $dc^2=10^{-8}$. Zum Vergleich sind die entsprechenden Kurven des einstufigen AON-Sternes (----) und des AON-Modells (.....) eingezeichnet.

$$\frac{1}{\tau^* k_n c^2} = (\bar{s}-1) \cdot \frac{\sum_{\nu=1}^{N-1} \left\{ (N-\nu) \left[\frac{(3\nu)^4}{\bar{s}-\bar{s}^{3-3\nu}} + \frac{(3\nu+2)^2}{\bar{s}-\bar{s}^{1-3\nu}} \right] \right\}}{\bar{s}(\bar{s} \overline{K' c^2}) - (\bar{s} \overline{K' c^2})^2 \cdot \frac{g \bar{y}_c^2}{1 + g \bar{y}_c^2 \overline{K' c^2}}} \quad (V.46)$$

Wegen (IV.41) erfolgt der Aufbau einer Helix mit r Wasserstoffbrücken langsamer als mit k_n , doch zeigt Abbildung 12, daß diese Verzögerung durch die höhere Anzahl g_r von Realisierungsmöglichkeiten für die einzelnen Spezies überkompensiert wird.

Will man auch die Häufigkeiten aller Zwischenstufen berücksichtigen, so muß man wegen (IV.42) unter Beachtung der Gewichte (15) ausgehen von

$$\vec{k}_r c^2 = \frac{2 k_n^2 \bar{s}^{r-3} g_r}{\sum_{i=1}^{r-2} \frac{\bar{s}^{i-1}}{i}} \quad (V.47)$$

Die damit gewonnenen mittleren Relaxationszeiten des "allgemeinen Steady-State-Sternes"

$$\tau_{k_n^2}^* = \frac{1}{\bar{s} \left(\overline{(sK_c^2)}' - \left(\overline{sK_c^2} \right)^2 \right)} \cdot \frac{g_{\vec{k}_r}^2}{1 + g_{\vec{k}_r}^2 \overline{K_c^2}} \quad (V.48)$$

sind ebenfalls in Abb. 12 eingetragen. Der schnelleren Reaktion eines jeden Einzelschrittes $\vec{k}_r$ (s.S. 37) gegenüber dem einfachen Steady-State-Schema entsprechen die wesentlich kürzeren Relaxationszeiten.

Da die beiden letzten Modelle das tatsächliche Verhalten am ehesten approximieren sollten, werden ihre Ergebnisse - neben dem des einstufigen AON-Sternes - mit den Messungen verglichen (Kap. VII.C.2). Für den allgemeinen Steady-State-Stern, der die größten Unterschiede zum einfachen Modell aufweist, wird deshalb in Abb. 13a die Aufspaltung der mittleren Relaxationszeit bei grös-

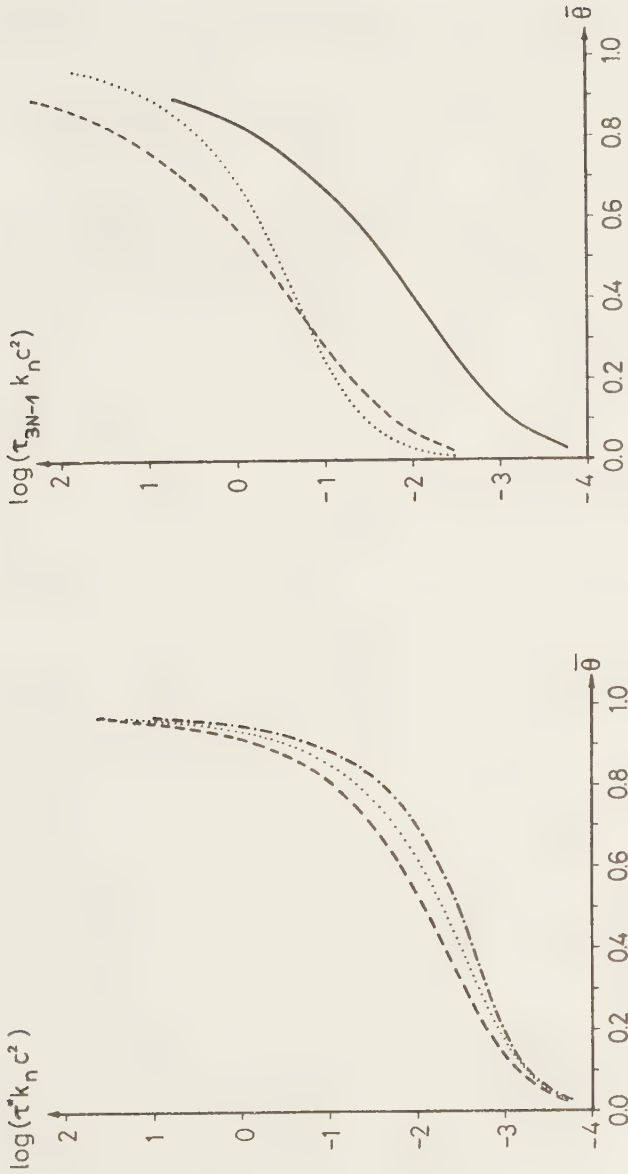


Abb. 13: Relaxationskinetik im allgemeinen Steady-State-Stern.

Kettenlänge $N = 12$; kooperativität $\phi c^2 = 10^{-8}$.

- a) Mittlere Relaxationszeit bei grossen Gleichgewichtsstörungen.
 ---: Aufwärtssprünge $\delta \ln s = +0,05$
 -----: Abwärtssprünge $\delta \ln s = -0,05$
: ideales Verhalten nach (32)
- b) längste Relaxationszeit (—) im Vergleich zu jener des einstufigen AON-Sternes (-----) und der einzigen Relaxationszeit im AON-Modell (.....).

seren Gleichgewichtsstörungen ($|\delta \ln s| = 0,05$ analog Abb. 11) dargestellt. Einen Vergleich der längsten Eigenzeit mit derjenigen des einstufigen AON-Sternes bringt Abb. 13b. Die Berechnung von $\tau_{3N-1} k_m c^1$ konnte auf die in Abschnitt C.2 beschriebene Weise durchgeführt werden, wobei die Größe $k_n c^2$ von (41) durch den Ausdruck (47) ersetzt wurde. Die Abschätzung (42) für die zu den einzelnen Relaxationszeiten gehörenden Gewichte war hier bei hohen Umwandlungsgraden schlechter als im einfachen Modell.

VI. EIN STATISTISCHES MODELL ZUR NUKLEATION

VI. A. Das Modell von Propagation und Nukleation

Beim Vergleich der im letzten Kapitel gewonnenen Aussagen mit den Messungen wird vorausgesetzt, daß der Nukleationsanteil σc^2 an der Keimbildung ($\sigma c^2 s^3$) im Gegensatz zum Propagationsschritt s von der Änderung der Temperatur unberührt bleibt. Der Grund für diese Annahme liegt in der im folgenden begründeten Vorstellung, daß die Keimbildungsschwierigkeit überwiegend durch einen Entropieverlust bedingt ist.

Da an der Keimbildung drei Propagationsschritte beteiligt sein sollen, wird vor der Behandlung der Nukleation der Mechanismus der Propagation untersucht, um dann diesen Anteil abtrennen zu können.

Betrachtet werden drei lange Ketten, deren Segmente 1 bis i ($i \ll N$) in einer Tripelhelix mit $3i-1$ Wasserstoffbrücken fixiert seien. Durch die große Nähe der Nachbarketten besitzen die nächsten Segmente $i+1$ nur wenig Möglichkeiten der sterischen Anordnung. Für jedes folgende Segment werden die Behinderungen kleiner, bis schließlich ein entferntes Segment j ($j < N$) keiner Beschränkung durch die Helixregion mehr unterliegt. Nach drei Propagationsschritten enthält die Helix $3i+3$ fixierte Tripeptide, die Segmente $i+2$ unterliegen den nämlichen Einschränkungen wie zuvor die Segmente $i+1$, und erst die Segmente $j+1$ sind als frei zu betrachten. Obwohl nur drei bereits weitgehend fixierte Segmente gebunden wurden, sind in der Gesamtbilanz wegen der "Fortpflanzung der Zustände" drei völlig freie Tripeptide starr festgelegt worden. Die Propagationskonstante s gibt also das Gleichgewicht an zwischen einem tripelhelicalen und

einem sterisch unbehinderten Segment.

Die partielle Festlegung der Tripeptide $i+1$ bis j einer jeden Kette erfolgte einmalig bei der Bildung des Keimes und wird durch den Anteil σ_{st} an der Nukleationskonstanten beschrieben (Abschn. C).

Bei kurzen Ketten lassen sich die durch Propagation und Nukleationsanteil σ_{st} verursachten Einschränkungen nicht so einfach trennen. Sobald sich die Helixregion nahe genug am Kettenende befindet, ist auch das letzte Segment teilweise festgelegt. Die Propagation sollte daher in der Nähe der Kettenenden erleichtert sein. Die Nukleation legt bei kurzen Ketten die Anordnungsmöglichkeiten einer geringeren Anzahl von Tripeptiden fest, weshalb für σ_{st} ein höherer Wert erwartet wird.

Für die Keimbildung wird eine Reaktionsfolge angenommen, in der die - physikalisch sicher vorhandene - Zwischenstufe eines Dimeren beliebiger Struktur unberücksichtigt bleiben kann, da sie nach Kapitel IV.B.1 wegen der Reaktionsordnung von drei nur als schnelles vorgelagertes Gleichgewicht mit geringer Stabilität auftreten kann:



Die erste Stufe beschreibt die Begegnungswahrscheinlichkeit der den Keim bildenden Molekülsegmente in der Lösung (σ_r wird entsprechend der Verwendung von σ in der Dimension $l^2/(\text{Mol Ketten})^2$ ausgedrückt), der zweite Schritt schränkt dann die Anzahl der Konformationsmöglichkeiten der drei Ketten ein, die sich jetzt gegenseitig behindern. Der letzte Schritt schließlich faßt die parallele Ausrichtung je eines Tripeptides einer jeden Kette zusammen. Vorstellungsmäßig sind Begegnung

und gegenseitige Behinderung zwei miteinander gekoppelte Phänomene, doch darf σ als thermodynamische Zustandsgröße zur Abschätzung zerlegt werden:

$$\sigma = \sigma_{Tr} \cdot \sigma_{St} \quad . \quad (VI.2)$$

Kinetisch sollte der Gesamtschritt $3A \rightleftharpoons A_3$ diffusionskontrolliert und daher sehr schnell erfolgen, da für A_3 keine spezielle Struktur vorgeschrieben ist.

VI. B. Anteil σ_{Tr} : Begegnung der Segmente

Dieser Anteil läßt sich nur in grober Näherung angeben, da von der Zwischenstufe des Dimeren lediglich bekannt ist, daß sie sehr instabil sein muß.

Der im folgenden gegebenen Abschätzung liegt die Idee zugrunde, daß die einzelnen Knäuelmoleküle ein durch den mittleren Trägheitsradius R_g bestimmtes Volumen v_A nur zum geringen Teil ausfüllen, so daß sie sich gegenseitig durchdringen können. Daraus wird die Begegnungswahrscheinlichkeit für die den Keim bildenden Segmente unter einigen Annahmen abgeleitet:

- 1) Zwischen verschiedenen Molekülfäden bestehen keine anziehenden oder abstoßenden Kräfte: die Begegnungswahrscheinlichkeit der Moleküle wird durch ihre mittlere Aufenthaltswahrscheinlichkeit im selben Volumenelement beschrieben.
- 2) Die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung eines Keimes ist proportional zum gemeinsamen Volumen ("Überdeckungsvolumen") der Molekülketten.
- 3) In einem Überdeckungsvolumen der Größe v_A entsteht

im Mittel genau ein direkter Kontakt zwischen je einem Segment einer jeden Kette.

- 4) Die Auswahl der den Keim aufbauenden Segmente erfolgt statistisch (Wahrscheinlichkeit N^{-3} für eine bestimmte Kombination von Tripeptiden).
- 5) Die Orientierung der Ketten am Ort des Kontaktes ist ebenfalls statistisch unbestimmt. Dadurch tritt der Faktor $1/4$ auf, der die Wahrscheinlichkeit für eine übereinstimmende Ausrichtung darstellt (nur "+" oder "-" für jede Kette; die weitere Fixierung ist in den an der Keimbildung beteiligten Propagationsschritten enthalten).

Die Annahmen 4 und 5 sind für ungeladene Ketten unmittelbar plausibel. Annahme 1 führt bei realen Ketten wegen deren Anziehung (sonst käme keine Tripelhelix zustande) zu einer zu kleinen Abschätzung für σ_{Tr} . Die Bedingungen 2 und 3 schließlich erscheinen weitgehend willkürlich, da Gaußketten ein kugelähnliches Volumen vor allem im Zentrum mit hoher Segmentdichte erfüllen. Durchdringen sich drei Ketten vollständig (Überdeckungsvolumen v_A), so sollte sogar die Bildung mehrerer Keime wahrscheinlich sein, von denen sich aber nur einer durchsetzen kann. Überdecken sich drei Coilmoleküle nur im Bereich ihrer Oberflächen, so sind dort die Kontaktmöglichkeiten wegen der geringen Segmentdichte wesentlich kleiner, etwa entstehende Helices können dafür ohne Konkurrenz durch andere Keime längs der gleichen Ketten wachsen.

Zunächst wird die Wahrscheinlichkeit zur Überdeckung dreier Moleküle zum "Berührungskomplex" A_3^{++} eines Trimers berechnet (in A_3^+ ist bereits die Wahrscheinlichkeit enthalten, daß sich bestimmte Segmente in gleicher Orientierung gegenüber stehen!). Die Anzahl $N_{LC A_3^{++} V}$ dieser Komplexe ist gleich der Zahl $N_{LC A V}$

an Monomeren multipliziert mit dem von Dimeren okkupierten Volumenanteil:

$$(a) \quad N_L C_{A_3}^* V = N_L C_A V \left[(N_L C_A V) \left(\frac{v_A}{V} \right) \right]^2 \quad \text{oder} \quad (VI.3)$$

$$(b) \quad \frac{C_{A_3}^*}{C_A^3} = (N_L v_A)^2 \quad .$$

Einsetzen der Annahmen 2 bis 5 ergibt die gesuchte konstante σ_r :

$$\sigma_r := \frac{C_{A_3}^*}{C_A^3} = \frac{(N_L v_A)^2}{4 N^3} \quad . \quad (VI.4)$$

Für v_A wird nun das durch den Trägheitsradius bestimmte mittlere Volumen $4/3 \cdot R_g^3 \pi$ der Gaußketten eingesetzt, wobei ⁶⁴⁾

$$R_g^2 = \frac{1}{6} \cdot 3N \ell^2 \quad (VI.5)$$

gilt (3N Aminosäuren pro Kette mit dem Abstand $l=3,85 \text{ \AA}$ zwischen zwei benachbarten C_α -Atomen ⁶⁴⁾). Die Abhängigkeit von (4) von der Kettenlänge fällt damit heraus:

$$\sigma_r = \frac{1}{18} (N_L \pi \ell^3)^2 = 6,5 \cdot 10^{-4} \ell^2 / \text{Md}^2 \quad (VI.6)$$

VI. C. Statistische Simulation der nukleationsbedingten Einschränkungen sterischer Anordnungen

Nach S. 76 beschreibt der Anteil σ_{st} die Beschränkung der Konformationsmöglichkeiten für die einzelnen Ketten durch das "Ausschlußvolumen": es ist keine Anord-

nung erlaubt, bei der zwei Aminosäuren in einen engeren als den van-der-Waals-Kontakt zu einander kämen. Die ursprüngliche Anzahl w_1 möglicher Konfigurationen einer statistisch verknäuelten Kette sinkt durch die Nachbarschaft zu den anderen Molekülen auf w_2 , und es gilt (ΔS_{st} ist der mit σ_{st} verbundene Entropieumsatz):

$$(a) \quad \sigma_{st} = \frac{w_2}{w_1} \quad (VI.7)$$

$$(b) \quad \Delta S_{st} = R \cdot \ln \frac{w_2}{w_1}$$

w_2/w_1 wurde durch bloßes Abzählen statistisch mit Hilfe eines Computers aufgebauter Strukturen ermittelt. Zur Vereinfachung der Berechnung solcher Strukturen wurde die Peptidbindung als starr angesetzt (Transstellung $\omega = 0^\circ$), für die anderen Backbone-Winkel wurden auch bei "frei" beweglicher Peptidkette nur wenige Paare $\{\psi, \varphi\}$ (Nomenklatur nach Edsall et al. ⁶⁵), s.a. Verzeichnis der Abkürzungen) zugelassen, die aus den von Flory ⁶⁴) angegebenen Energiekarten abgelesen wurden (Tab. 2). Die Energieminima besitzen etwa die gleiche Tiefe, so daß sie als statistisch gleich wahrscheinlich angenommen werden konnten.

	Gly						Pro	
ψ	104	112	98	248	256	262	122	122
φ	343	119	272	241	17	88	324	125

Tab. 2: Zur Kettensimulation zugelassene Backbone-Winkel (in Grad). Das jeweils erste Winkel-paar führt zum Aufbau der tripelhelicalen Struktur.

Das verwendete Computerprogramm geht von festen Koordinaten des Keimes aus (entnommen aus Yonath und Traub ¹⁰). Durch statistische Auswahl eines Winkelpaares nach Tab. 2 zur letzten fixierten Aminosäure von Strang I werden deren Konfiguration und die Koordinaten des folgenden C_{α} -Atoms festgelegt. Schrittweise wird so die ganze Kette unter ausschließlicher Berücksichtigung der C_{α} -Atome aufgebaut, bevor die zweite und schließlich die letzte der am Keim beteiligten Ketten konstruiert werden. Unmittelbar nach der Berechnung eines jeden C_{α} -Atoms wird die Entfernung zu allen bereits ermittelten Positionen abgefragt. Unterhalb eines Mindestabstands (gewählt wurden 2 Å, ein Test mit 2,3 Å brachte nur geringfügig größere Einschränkungen für die Ketten) gilt die Konfiguration als verboten, es muß ein anderes Winkelpaar gesucht werden. Die damit verbundene Reduzierung zugelassener Winkelpaare (1/6 bei Gly, 1/2 bei Pro, s. Tab. 2) wird nur registriert, wenn die Kette nicht gegen sich selbst stößt: es wird also nicht die absolute Anzahl von Strukturen gezählt, sondern direkt der relative Anteil der durch den Keim verbotenen Konfigurationen. Tritt eine Kollision bei sämtlichen für die laufende Aminosäure verfügbaren Winkelpaaren auf, so gilt bereits der Platz des vorhergehenden C_{α} -Atoms als verboten: er wird ebenso wie die späteren Einschränkungen gelöscht, der Aufbau der Kette beginnt einen Schritt tiefer von neuem. Nach Durchrechnen der drei Einzelstränge stellt das Produkt über die verbleibenden Konfigurationsmöglichkeiten direkt das Verhältnis (7a) der Besetzungszahlen dar.

Da die drei Ketten zur Ersparnis von Rechenzeit nacheinander aufgebaut werden, kann auch der Fall eintreten, daß sich eine Kette gar nicht aus dem Keim aufbauen läßt, weil eine bereits fertig berechnete zu dicht an die-

sem vorbeiläuft. Hier wird die Kettensimulation abgebrochen, die Struktur erhält die Wahrscheinlichkeit Null und wird bei der Mittelung über viele Trimere mitberücksichtigt.

Abbruchbedingung ist eine nach den Gesetzen der Fehlerrechnung ermittelte Genauigkeit von 5%, doch wurden nie mehr als 3000 Trimere simuliert: der Mittelwert änderte sich während der letzten 1000 Simulationen um weniger als 1%.

Die gegenseitige Behinderung wird umso größer erwartet, je länger die Ketten sind. Sie sollte gegen einen Grenzwert streben, doch konnten wegen des stark anwachsenden numerischen Aufwandes nur die Kettenlängen $N=6$ und $N=12$ Tripeptide getestet werden. Für diese beiden Längen wurden die Strukturen für $(\text{Gly-Pro-Pro})_N$ und $(\text{Gly-Gly-Pro})_N$ bei Keimbildung am Kettenende und in der Mitte simuliert. Die Ergebnisse sind in Tab. 3 zusammengestellt:

		a) $(\text{Gly-Pro-Pro})_N$		b) $(\text{Gly-Gly-Pro})_N$	
N	keim	Ende	Mitte	Ende	Mitte
6		0,29	0,15	0,4	0,17
		(-2,5)	(-3,8)	(-1,8)	(-3,5)
12		0,085	0,035	0,14	0,10
		(-4,9)	(-6,7)	(-3,9)	(-4,6)

Tab. 3: Durch Kettensimulation berechneter sterischer Anteil ϕ_{st} an der Nukleationskonstanten (in Klammern: Entropieumsatz in Clausius/Mol Trimer).

Die Messungen der Tripelhelixbildung erfolgten an einem natürlichen Peptid, welches zu je einem Drittel aus Gly und Pro bzw. Hyp zusammengesetzt ist. Der Rest besteht aus zahlreichen unterschiedlichen Aminosäuren, die wegen ihrer beweglichen Seitenketten eine Mittelstellung zwischen Glycin und den Iminosäuren einnehmen. Für CB2 wird daher ein mittlerer Wert zwischen den Daten von $(\text{Gly-Pro-Pro})_{12}$ und $(\text{Gly-Gly-Pro})_{12}$ erwartet. Er wird für beliebige Position des Keimes angesetzt zu

$$\sigma_{\text{st}} \Big|_{\text{CB2}} \approx 8 (\pm 5) \cdot 10^{-2} . \quad (\text{VI.8})$$

VI. D. Gesamtbilanz der Nukleation

Der Nukleationsparameter σ wurde in zwei Anteile zerlegt, die beide durch statistische Betrachtungen abgeschätzt werden konnten. Zusätzlich etwa vorhandene Beiträge durch Kräfte zwischen den Molekülsträngen oder durch Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel blieben dabei unberücksichtigt. Soweit sie mit einem Enthalpieumsatz verbunden sind, bleiben sie auch bei der Auswertung experimenteller Umwandlungskurven nach der in VII.C.1.b beschriebenen Methode unentdeckt, da σ dort nur wegen seiner Temperaturunabhängigkeit ($\Delta H_k = 0$ für den durch die Nukleationskonstante erfaßten Anteil am Gleichgewicht) vom Propagationsschritt getrennt werden kann: ein gegebenenfalls vorhandenes ΔH_k wird - zusammen mit dem der speziellen Wechselwirkung zugeordneten Entropieumsatz - auf die Propagationsschritte aufgeteilt.

Für die unter Ausschluß derartiger Kräfte abgeschätzte Nukleationskonstante erhält man zusammenfassend

aus den Abschnitten B und C

$$\sigma \approx 5 \cdot 10^{-5} \frac{l^2}{Mc^2} . \quad (\text{VI.9})$$

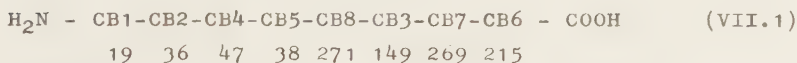
wegen der zahlreichen in (6) und (8) enthaltenen einschränkenden Annahmen kann die Abschätzung nicht mehr als einen Hinweis auf die Größenordnung darstellen. In diesem Rahmen stimmt sie gut mit den Meßergebnissen überein (Tab. 4, S. 95).

VII. MESSUNGEN AM PEPTID CB2 AUS DER α 1-KETTE DES KOLLAGENS

VII. A. Peptid und Lösungsmittel

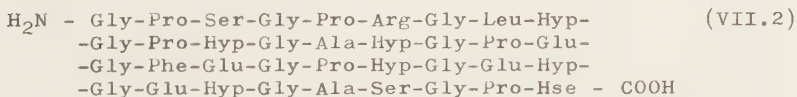
VII. A. 1. Das Kollagenfragment α 1-CB2

Die aus dem Englischen stammende Bezeichnung deutet auf die Gewinnung des Fragments durch Bromcyan-Spaltung (cyanogen bromide) der α 1-Kette hin, wobei die Ziffer eine historische Fraktionsnummer darstellt und nur zufällig mit der Stellung dieses Fragments bezüglich der anderen CB-Peptide innerhalb der α 1-Kette identisch ist ¹²⁾;



(Die Zahlen bezeichnen die Anzahl der im Peptid enthaltenen Aminosäuren).

Aus der Sequenz ⁶⁶⁾



findet man das Molekulargewicht von 3323. Der Aufbau einer Tripelhelix mit chemisch unterschiedlichen Tripeptiden wird durch den hohen Iminosäuregehalt von 33,33% begünstigt ^{13,14)}. Die "Denaturierung" der Helix kann im Spektrum der optischen Rotationsdispersion (ORD) oder des Circular dichroismus (CD) verfolgt werden. Sie verläuft erwartungsgemäß reversibel, da das Fragment aus der α 1-Kette nach Denaturierung des Kollagens gewonnen wird und somit anfangs in der Coil-Form vorliegt.

VII. A. 2. Citratpuffer und Peptidkonzentration

Alle Konformationsumwandlungen wurden in einem 0,25M Citratpuffer (22,06 g Natriumcitrat·2H₂O + 31,53 g Zitronensäure pro ltr. Wasser + ca. 0,02% Natriumazid) bei einem pH-Wert von 3,7 durch Temperaturänderungen induziert.

Insgesamt standen etwa 30 mg CB2 zur Verfügung, die für alle Versuchsreihen ausreichen mußten. Zur ersten Meßserie wurde die gesamte Substanz in der zur Messung erforderlichen Mindestmenge an Puffer gelöst, für spätere Versuche wurde jeweils auf etwa halbe Konzentration weiter verdünnt. Die Konzentration der Stammlösung wurde nach Abzweigen einer definiert verdünnten "Eichlösung" aus den Ergebnissen einer Aminosäureanalyse für Ala, Leu, Phe und Arg ermittelt. Die anderen Konzentrationen könnten dann durch Vergleich der optischen Drehungen nach

$$\frac{c_1}{c_2} = \frac{\alpha_1}{\alpha_2} \quad (\text{VII.3})$$

bestimmt werden, doch wurde zur Auswertung der Messungen ein anderes Verfahren vorgezogen (Abschn. C.1).

VII. B. Meßverfahren

VII. B. 1. Messung der optischen Aktivität zur Bestimmung des Umwandlungsgrades

Die optische Drehung wurde an einem Cary-60 Spektropolarimeter (Firma Varian) bei einer Wellenlänge von 300 nm gemessen. Die Aufnahme der Umwandlungskurve erfolgte mit einer thermostatisierbaren Meßzelle der optischen Weglänge 1 mm ("Perkin-Elmer"-ORD-Küvette), welche bezüglich des Thermostaten hinter die Kinetikzelle (Ab-

schnitt 2) geschaltet wurde, so daß nach jeder Kinetikmessung der zugehörige Umwandlungsgrad abgelesen werden konnte.

VII. B. 2, "Poor Man's T-Jump" zur Beobachtung der
Reaktionskinetik

Bei den verwendeten Konzentrationen erfolgen die Umwandlungen - je nach der Temperatur - im Bereich zwischen einer knappen Minute und vielen Stunden. Die zeitliche Auflösung durch das Cary-60 reicht also aus, die Einstellung der Temperatur kann bei geeigneter Zellenkonstruktion durch bloßen Wechsel zwischen zwei Thermostaten geschehen ⁶⁷⁾. Diese Umschaltung erfolgte über drei Dreiweg-Magnetventile (Hersteller: Skinner, Holland) nach dem in Abb. 14A (S. 88) dargestellten Schema.

Im Unterschied zur "Gleichgewichtsküvette" hatte die Meßzelle zur Beobachtung der Relaxationskinetik ⁶⁸⁾ (Abb. 14B) eine optische Weglänge von 10 mm, um mit ihr einen kleinen Teil der Umwandlungskurve gut auflösen zu können. Die Lösung befindet sich in einem Trog aus Platinblech, der in einen Thermostatisiermantel aus Messing eingelötet ist. Später wurde die gesamte Zelle zum Schutz der Lösung vor den Lötstellen vergoldet.

Der gesamte Messingmantel unterhalb der herstellungsbedingten Kappe wird von der Thermostatenflüssigkeit durchströmt, die somit über den Lösungsmeniskus hinaufreicht und dadurch eine schnelle Wärmeübertragung ermöglicht. Diese wird auch durch die schmale Form des Lösungsvolumens (Breite ca. 2,5 mm) begünstigt, welche zugleich die Messung geringer Substanzmengen gestattet.

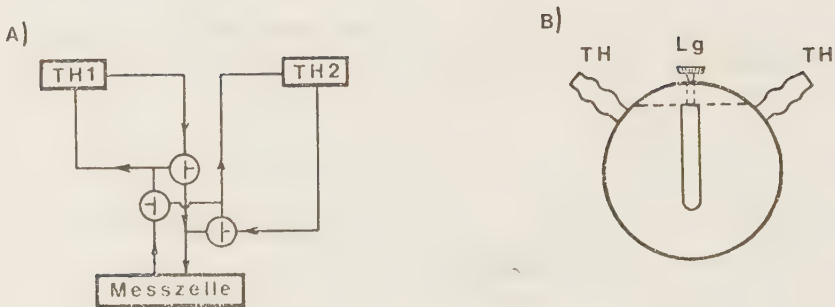


Abb. 14: "Poor Man's T-Jump" nach F.M. Pohl 67,68)

- A) Schema zur Schaltung der Thermostaten TH1 und TH2 mit drei Dreiwegventilen V1, V2 und V3. In der angegebenen Stellung wird die Meßzelle durch TH1 thermostatisiert.
- B) Blick auf die Meßzelle in Richtung der optischen Achse. Lg: Einfüllöffnung für die Lösung; TH: Thermostatanschluß.

Auf beiden Seiten wird die Küvette mit Fenstern aus Quarzglas verschlossen. Bei Temperaturänderung tritt wegen der unterschiedlichen thermischen Ausdehnung von Glas und Metall eine Spannungsdoppelbrechung auf, die eine zusätzliche optische Aktivität vortäuscht. Sie ist nicht reproduzierbar und klingt je nach Festigkeit des Kittes ab. Um dennoch auswertbare Messungen vornehmen zu können, mußten die Glasplättchen mit einem elastischen Silikonkautschuk aufgeklebt werden. Die Spannungsdoppelbrechung war nun der Größe und Abklingzeit nach vernachlässigbar, doch konnte ein Auflösen des Klebstoffes unter der Einwirkung von Temperaturänderungen und Lösung auf die Dauer nicht verhindert werden. Da mangels Substanz stets dieselbe Lösung - auch für die Gleichgewichtsmessungen - weiterverwendet werden mußte, war so eine im Verlauf der Meßserien zunehmende Verunreinigung der Lösung unvermeidbar.

Die Aufheizzeit der Probe (Temperaturangleich auf 1/e) wurde mit einer wässrigen Lösung von Poly-N⁵-(3-Hydroxypropyl)-L-glutamin (Polymerisationsgrad über 300) zu 8 sec bestimmt. Als Meßeffect diente dabei die Änderung der optischen Drehung bei der α -Helix-Knäuel-Umwandlung dieses Peptids ⁶⁹⁾: diese erfolgt im Millisekundenbereich und liefert so eine sehr rasche Anzeige der über das ganze Volumen gemittelten Temperatur.

Die Temperatur der Thermostatenflüssigkeit wurde während aller Messungen unmittelbar am Ausgang der Kinetikzelle mit Hilfe eines Heißeiters gemessen. Über kürzere Zeiträume betrugen die Schwankungen weniger als 0,03°, doch traten bei langer Meßdauer in Nähe des Gefrierpunktes Drifts bis zu einem Zehntel Grad auf.

VII. B. 3. Untersuchungen mit der analytischen Ultrazentrifuge

Ein Gleichgewichtslauf in der analytischen Ultrazentrifuge ("Spinco E", Firma Beckman) sollte sicherstellen, daß die im ORD-Spektrum verfolgten Änderungen nur auf der Tripelhelixbildung beruhen und nicht auch durch eine Aggregation wie beim Kollagen ^{2,3)} hervorgerufen werden. Eine aus der Stammlösung abgezweigte Probe erreichte bei 30000 U/min und einer Rotortemperatur von ca. 8°C nach etwa 15 Stunden das Gleichgewicht. Die logarithmische Auftragung der optischen Dichte gegen r^2 nach ⁷⁰⁾

$$M = \frac{2RT}{\omega^2 \cdot (1 - \bar{v}g)} \cdot \frac{d \ln c}{dr^2} \quad (\text{VII.4})$$

(Molekulargewicht M, Kreisfrequenz ω des Rotors, $\bar{v}$ = Partialvolumen des Peptids und g = Dichte der Lösung; r bezeichnet den Abstand des betrachteten Lösungsvolumens von der Rotorachse)

zeigt die Existenz nur zweier Molekulargewichte an: nach Abzug der für $M=3323$ und $\bar{v}_g=0,71$ berechneten Kurve der Einzelstränge bleibt eine Gerade, aus deren Steigung man bei gleichem $\bar{v}_g$ ein Molekulargewicht von ca. 12800 erhält, während das Ergebnis bei Annahme eines etwas größeren Partialvolumens ($\bar{v}_g=0,75$) auf etwa 11000 abfällt. Leichte und schwere Spezies standen etwa im Mengenverhältnis 2:1, höhere Molekulargewichte konnten in dieser Messung nicht gefunden werden. Dieses Resultat stimmt mit den Ergebnissen von Piez und Sherman ⁶⁾ überein und entspricht den Aussagen des staggering-zipper-Modells, denen zufolge nur sehr kurze Kettenstücke über die Helix-region hinausragen und daher kaum die Möglichkeit zur Anlagerung weiterer Ketten bieten.

VII. C. Auswertung und Vergleich mit den theoretischen Ergebnissen

VII. C. 1. Umwandlungskurven

VII. C. 1. a. Normierung auf $[\alpha]^A - [\alpha]^C$

Drei Messungen an zwei verschiedenen Aminosäureanalysatoren brachten für die Eichkonzentration (Abschnitt A.2) stark unterschiedliche Resultate: 1,32; 1,16 und 1,01 (Mittelwert 1,16) mMol/l. Daraus ergab sich für die Stammlösung eine Konzentration von 7,85 mMol/l, ihre optische Drehung bei 38°C (Coilregion) betrug $-0,253^\circ$.

Wegen der zunehmenden Trübung der Lösung durch aufgelösten Klebstoff (Abschn. B.2) führt die Anwendung von (3) auf die Drehungen α^C der Coilzustände zu Unregelmäs-

sigkeiten bei der Bestimmung der anderen Konzentrationen. Die "Helix-Coil-Amplitude" $\alpha^h - \alpha^c$ sollte dagegen unverändert bleiben, doch konnte α^h nur näherungsweise abgelesen werden, da das Helixniveau unerreicht blieb.

Entsprechend Gleichung (IV.10) (S. 24) besteht eine eindeutige Beziehung zwischen dem Abstand der Umwandlungskurven und den zugehörigen Konzentrationen, da ΔH nach (IV.9) durch die Steilheit der Kurven festgelegt ist. Die Konzentrationen lassen sich auf diese Weise bestimmen. Zuvor sollten sie zur Vereinfachung des numerischen Vergleichs auf eine gemeinsame Skala normiert werden, wofür die durch ⁷¹⁾

$$[\alpha] := \alpha \cdot \frac{10^4}{c' \cdot l} \quad (\text{VII.5})$$

(Konzentration c' in g/100ml; optische Weglänge l in mm; Drehwinkel α in Grad)

definierte Differenz $[\alpha]^h - [\alpha]^c$ der spezifischen Drehungen verwendet wurde. Die jetzt durch die Ungenauigkeit eingeführten Schwankungen in T_m (Temperatur zum Umwandlungsgrad 1/2) ist wegen der großen Steilheit der Kurven so gering, daß diese Methode die genauesten Konzentrationsangaben relativ zur Stammlösung liefern sollte.

Bei der Ablesung der θ -Werte aus den Umwandlungskurven muß man beachten, daß die optische Aktivität des reinen Knäuelzustandes ebenso wie die der Tripelhelix eine Funktion der Temperatur ist. Diese Abhängigkeit wurde als linear angesetzt und ließ sich für die Coilform leicht aus den Messungen gewinnen, während sie wegen des unerreichbaren Plateaus für die Tripelhelix unsicher blieb. Es wurde deshalb die Plateauregion einer 0,34%-igen Lösung von nativem Kollagen (im Zitratpuffer zwischen 6 und 24°C) ausgemessen und das Verhältnis von Drehungsänderung (pro Temperaturintervall) zur Gesamt-

drehung auf die Tripelhelix des CB2 übertragen. Die in das Diagramm 15 (S. 97) eingetragenen Geraden besitzen die Temperaturkoeffizienten

$$\begin{aligned} - \frac{\delta [\alpha_{\text{H}_2\text{O}}]^{\text{H}}}{\delta T} &= -3,25 \frac{\text{Winkelgrad}}{\text{Grad Celsius}} \\ - \frac{\delta [\alpha_{\text{H}_2\text{O}}]^{\text{C}}}{\delta T} &= -2,15 \frac{\text{Winkelgrad}}{\text{Grad Celsius}} \end{aligned} \quad (\text{VII.6})$$

VII. C. 1. b. Numerische Anpassung der Parameter an die Messungen

Der Vergleich von Theorie und Experiment geht von der Annahme aus, daß die Propagationskonstante s als mikroskopische Gleichgewichtskonstante der van't-Hoff-Beziehung genügt:

$$\begin{aligned} \text{(a)} \quad s &= s_0 e^{-\frac{\Delta H_s}{RT}} \quad \text{mit} \\ \text{(b)} \quad s_0 &= e^{\frac{\Delta S}{R}} \end{aligned} \quad (\text{VII.7})$$

Von den vier unbekannten Größen δ , s_0 , ΔH_s und $[\alpha]^{\text{H}}$ sind die beiden ersten nur von einem Entropieumsatz abhängig und wirken sich deshalb ähnlich auf die Umwandlungskurven aus. Im AON-Fall wird δ immer mit der gleichen Potenz $3N-1$ von s_0 verknüpft und ist daher nicht abtrennbar. Aber auch in den staggering-zipper-Modellen sind die deutlich tieferen Potenzen von s_0 wegen der Population vernachlässigbar. Um dennoch eine Interpretation im Rahmen des Sternschemas vornehmen zu können, wurden die von Kobayashi et al. ¹¹⁾ publizierten Umwandlungskurven

für (Pro-Pro-Gly)_N mit N = 10, 15 und 20 zur Festlegung von δ verwendet, da hier verschiedene Polymerisationsgrade die Unterscheidung zwischen δ und s_0 ermöglichen. Die Helix- und Knäuelplateaus dieser Umwandlungskurven wurden wegen der großen Diskrepanzen für jede Kurve individuell und fest angenommen, so daß nur die drei Größen δ , s_0 und ΔH_s zu bestimmen waren. Wegen des unterschiedlichen chemischen Aufbaus muß bei der Übertragung des so berechneten Nukleationsparameters auf CB2 mit einem größeren Fehler gerechnet werden (s. z.B. die Werte der Tabelle 2, S. 82, für δ_{st}), doch stand kein geeigneteres System für die δ -Bestimmung zur Verfügung.

Die Anpassung der theoretischen Parameter an die experimentell bestimmten Umwandlungskurven geschah durch iterative Minimalisierung der Abweichung zwischen theoretischen Werten und Meßdaten. Das hierzu verwendete Computerprogramm "Gausshaus" (nach Marquardt ⁷²) entwickelt am University of Wisconsin Computing Center) stellt eine Kombination der linearen "Gauss-Näherung" mit der im großen Abstand vom Bestwert schneller konvergierenden "Methode des steilsten Abfalls" dar. Betrachtet man die Fehlerquadratsumme Σ als Funktion der Parameter p_i , so gilt im Minimum $\partial \Sigma / \partial p_i = 0$. Außerhalb des Minimums gibt dieser Differentialquotient ein Maß für die notwendige Korrektur, wie aus der Taylorentwicklung von Σ nach den Parametern bei Vernachlässigung höherer Ordnung folgt. Gerade diese Vernachlässigung der Terme höherer Ordnung kann aber in großer Entfernung vom Minimum die Konvergenz des Verfahrens erschweren, ja sogar zu schlechteren Werten für Σ führen, wenn der Korrekturvektor δp zu lang wird. Zur Kontrolle sucht man daher das Minimum von Σ bezüglich einer Kugelschale um den Ausgangsvektor p_0 ; es gibt im Grenzfall eines verschwindenden Kugelradius die Richtung des steilsten Abfalls von Σ bezüglich p an.

Die im Gaushausprogramm verwendete Interpolation zwischen beiden Methoden beginnt nun mit sehr kleinem Kugelradius, der dann - unter Kontrolle der Verbesserung - schrittweise bis zur Länge des aus der Gauss-Näherung folgenden Vektors erhöht wird.

Die mit Hilfe der Gaushaus-Iteration aus den Messungen Kobayashis bestimmten Parameter streuten bei unterschiedlicher Wahl der Ausgangsgrößen p_0 erheblich, was durch die Existenz verschiedener Minima bedingt ist, die alle bezüglich der erzielten Fehlerquadratsumme etwa die gleiche "Tiefe" aufwiesen. Da aber alle angepaßten σ -Werte zwischen den Ausgangswerten der Iteration und - je nach dem zugrunde gelegten Modell - Zahlen aus dem Intervall $\{10^{-3}, 10^{-5}\}$ lagen, konnten als Bestwerte für das Modell des AON-Sterns (Kap. V.B.1) $\sigma = 4 \cdot 10^{-4}$ und für den mehrstufigen Stern (V.B.2) $\sigma = 2 \cdot 10^{-5} \text{ l}^2/\text{Mol}^2$ übernommen werden. Eine Liste auch der ΔH -Werte gibt Tab. 4.

Die Auswertung der eigenen Messungen erfolgte zusammen mit der Bestimmung der CB2-Konzentrationen. Zunächst wurden die Parameter s_0 , ΔH_s und $[\alpha]^A|_{\sigma^\circ C}$ aus den normierten Umwandlungskurven (Abschnitt a) optimiert. Mit diesen Parametern wurden dann diejenigen Konzentrationen ermittelt, die die Lage der Umwandlungskurven relativ zu jener der Stammlösung am besten beschreiben, bevor wiederum die Parameter verbessert wurden. Die nun folgende Korrektur der Konzentrationen brachte keine wesentlichen Änderungen mehr, so daß die Iteration bald abgebrochen werden konnte. Die nach den beiden staggering-zipper-Modellen (Kap. V.B. 1 bzw. 2) ermittelten Konzentrationen unterscheiden sich um weniger als 1%, während sie zur Erfüllung des AON-Modells wesentlich höher angesetzt werden mußten. Die geringsten Abweichungen von den aus der Helix-Coil-Amplitude bestimmten Konzentrationen brachte die Voraussetzung des mehrstufigen Sterns.

	AON	AON-Stern	mehrst. Stern	Kobayashi 11), b)	Piez, Sherman	Pri- valov, Tik- topulo
Σ (Grad ²)	7400	9370	12400	AON- Stern	7)	13)
$[\alpha]_{10}^c$ (Grad)	-2170	-2200	-2255	Stern	c)	d)
d	- e)	$4 \cdot 10^{-4}$ f)	$2 \cdot 10^{-5}$ f)	$2 \cdot 10^{-5}$	-	-
ΔS_d (Clausius Mol CB2)	- e)	-15,6 f)	-21,5 f)	-15,6	-	-
S_e	- e)	0,017	0,012	0,05	-	0,015
ΔS_e (Clausius Mol Bindung)	- e)	-8,12	-8,72	-6,0	-	-8,3
$\Delta S_f + 35 \Delta S_e$ (Clausius Mol CB2)	-276	-300	-327	-226	-277	-
ΔH_s (Kcal Mol Bindung)	-2,48	-2,66	-2,86	-2,20	-2,66	-2,70

Tab. 4: Durch numerische Anpassung gewonnene Parameter

Bezeichnungen: Nukleation $d = \exp(\Delta S_d/R)$; Propagation $s = s_0 \cdot \exp(-\Delta H_f/RT)$ mit $s_0 = \exp(\Delta S_e/R)$, Die Fehlerquadratsumme Σ wurde aus den $[\alpha]$ -Werten für alle 6 Konzentrationen in Schritten von 10°C zwischen 6 und 240°C gebildet.

a) $[\alpha]_{10}^c$ = -1050 Grad

c) nach dem AON-Modell

e) nicht angebar

b) durch Anpassung der publizierten Umwandlungskurven

d) durch lineare Extrapolation auf den Iminosäuregehalt von CB2

f) übernommen aus Interpretation der Messungen Kobayashis

Tabelle 4 stellt die wichtigsten aus den Anpassungen bestimmten Größen sowie die Fehlerquadratsumme Σ als Maß für die Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment zusammen. Den eigenen Messungen sind in den Spalten 4 und 5 die Ergebnisse aus der Anpassung der von Kobayashi veröffentlichten Umwandlungskurven gegenübergestellt. Die Daten der 6. Spalte ermittelten Piez und Sherman ⁷⁾ am CB2 unter der Annahme eines AON-Verhaltens, und die letzte Spalte enthält Entropie- und Enthalpieumsatz des Propagationsschrittes, wie sie bei Extrapolation der Kollagenmessungen von Privalov und Tiktopulo ¹³⁾ auf den Iminosäuregehalt von CB2 zu erwarten wären.

Die in der vorletzten Zeile der Tabelle angegebene Entropie $\Delta S_d + (3N-1) \cdot \Delta S_o$ entspricht im AON-Modell der gesamten Umwandlungsentropie für ein Mol CB2. Bei Zugrundelegung der anderen Modelle ist der wirkliche Umsatz geringer, da nicht alle Wasserstoffbrücken geschlossen werden.

Die mit den Parametern von Tabelle 4 berechneten Umwandlungskurven haben für alle Modelle eine sehr ähnliche Gestalt. Eine Unterscheidung zwischen den Modellen kann demnach aus den Gleichgewichtsmessungen nicht gegeben werden; der geringsten Fehlerquadratsumme im AON-Modell stehen die höchsten Abweichungen der zur Beschreibung der Umwandlungskurven nötigen Konzentrationen von den aus der Helix-Coil-Amplitude berechneten Werten gegenüber.

Wegen der großen Ähnlichkeit der zu den einzelnen Modellen gehörenden Umwandlungskurven zeigt Abb. 15 nur den Vergleich zwischen den Meßpunkten und den aus dem AON-Stern gewonnenen theoretischen Kurven.

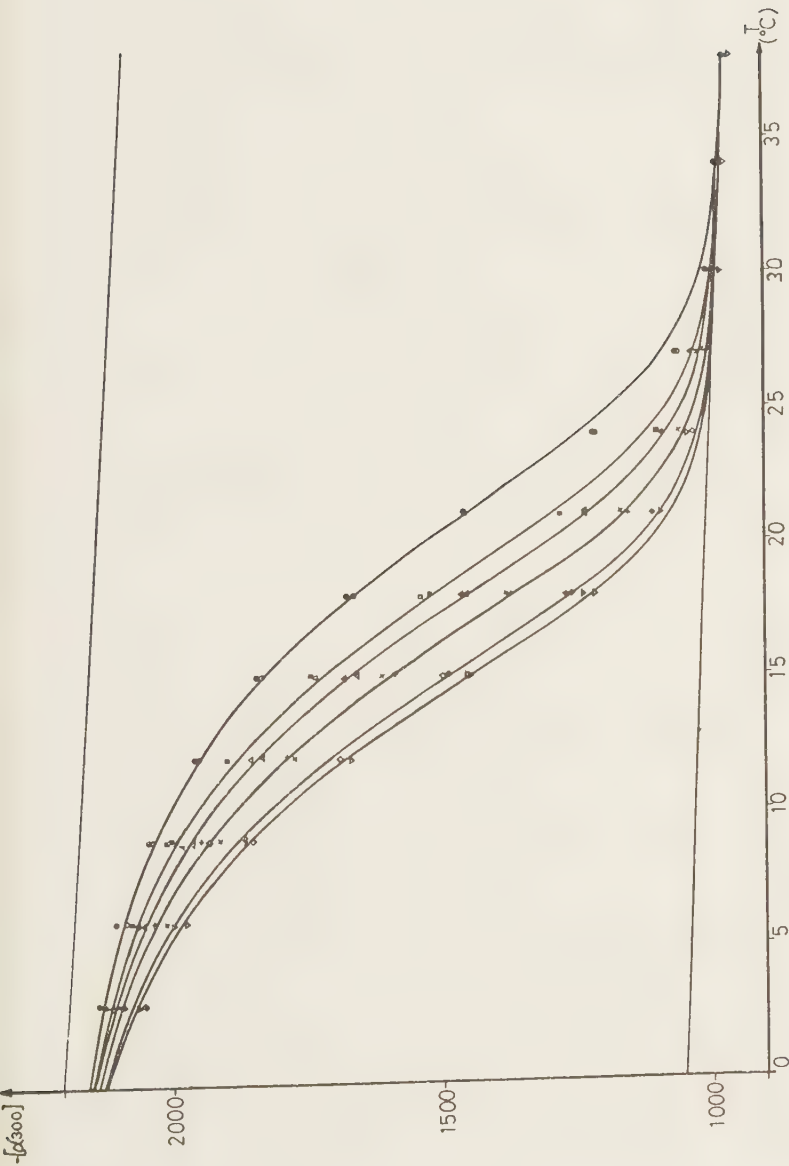


Abb. 15: Messpunkte und Umwandlungskurven nach dem AON-Stern für CB2 (Parameter nach Tab. 4) Konzentrationen (in mmol/l): 7,85 (○), 4,41 (□), 3,46 (Δ), 2,53 (+), 1,71 (◇), 1,49 (▽). offene Symbole und "+": Abwärtssprünge bzgl. Θ (Sprünge von tieferen Temperaturen aus). gefüllte Symbole und "x": Aufwärtssprünge.

VII. C. 2. Kinetik

Die zeitlichen Änderungen des Umwandlungsgrades wurden wie die Gleichgewichtsmessungen über die optische Drehung verfolgt. Bei der Auswertung der vom Gerät aufgezeichneten Kurven war zu beachten, daß wegen (6) eine Drehwinkeländerung als unmittelbare Folge des Temperaturwechsels bereits auftritt, bevor die Strukturumwandlung einsetzt. Es mußte also die Drehung zur Zeit $t=0$ additiv um einen Anteil korrigiert werden, der von der Sprunghöhe und -richtung ΔT abhängt:

$$\theta(c) \frac{\delta[\alpha]^h}{\delta T} \cdot \Delta T + (1 - \theta(c)) \frac{\delta[\alpha]^c}{\delta T} \cdot \Delta T \quad (\text{VII.8})$$

Die in (8) einzusetzenden Temperaturkoeffizienten (6) entsprechen den Steigungen der in Abb. 15 eingezeichneten Geraden.

VII. C. 2. a. Reaktionsordnung

Die in Kap. V aufgestellten Kinetikmodelle vernachlässigen das Auftreten von dimeren Zwischenstufen und führen damit zu einer Reaktion dritter Ordnung. Zur Kontrolle wurde die Reaktionsordnung von CB2 durch Abschrecken der Lösung von 38 auf 18°C gemessen. Bei der ersten Temperatur war die Bedingung $\theta=0$ als Ausgangspunkt der Reaktion $3A \rightarrow B$ für alle Konzentrationen gegeben. Mit der Reaktionsordnung n wird dann der Reaktionsbeginn beschrieben durch

$$\begin{aligned} (a) \quad \left. \frac{dc_A}{dt} \right|_{t=0} &= k c_A^n \quad \text{oder} \\ (b) \quad \log \frac{d\theta}{dt} &= n \log c + \text{const.} \end{aligned} \quad (\text{VII.9})$$

Die doppelt logarithmische Auftragung der Anfangssteigungen gegen die Konzentration ergab eine Gerade mit der Steigung $2,9 \pm 0,2$, was zusammen mit dem Literaturwert 2,8 (Piez-Sherman ⁷⁾) die Berechtigung der Voraussetzung bestätigt.

VII. C. 2. b. Relaxationskinetik im Vergleich zum Sternschema

Jede Meßserie der Relaxationskinetik bestand aus Temperatursprüngen von $\pm 3^{\circ}\text{C}$ zwischen 3 und 30°C . Nach Abzug der Korrektur (8) wurden die Relaxationskurven auf $\delta\theta = 1$ normiert und logarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Die Kurven sind deutlich gekrümmt (Abb. 16, S. 100) und lassen sich nicht mehr mit einer einfachen Reaktion nach dem AON-Verhalten erklären. Die Normierung zeigte, daß die Relaxationskurve der Aufwärtssprünge (bzgl. θ) stets unterhalb jener der Abwärtssprünge zum gleichen Endwert verläuft, was in Kap. V.C.3 theoretisch begründet wurde. Das Auftreten nur einer Zwischenstufe muß nach Ikai und Tanford ⁶⁰⁾ ausgeschlossen werden, da in jeder Relaxationskurve mindestens zwei Relaxationszeiten mit positivem Gewicht unterscheidbar sind. Aus den Anfangssteigungen wurden nach (III.25) (S. 15) die mittleren Relaxationszeiten gewonnen, die je nach Konzentration und Gleichgewichtstemperatur zwischen der Grenze der Auflösbarkeit (20 sec) und 4500 sec liegen. Die Endsteigungen der Kurven sind für beide Sprungrichtungen gleich und sollten die längste Relaxationszeit angeben, für die ja nach Kap. V.C.2 das größte Gewicht erwartet wird. Für tiefe Temperaturen war diese Schlußsteigung jedoch schwer zu messen, was neben dem fallenden Gewicht von τ_{3N-1} (verstärkte Mitberücksichtigung kürzerer Zeiten) durch die größeren Temperaturschwankun-

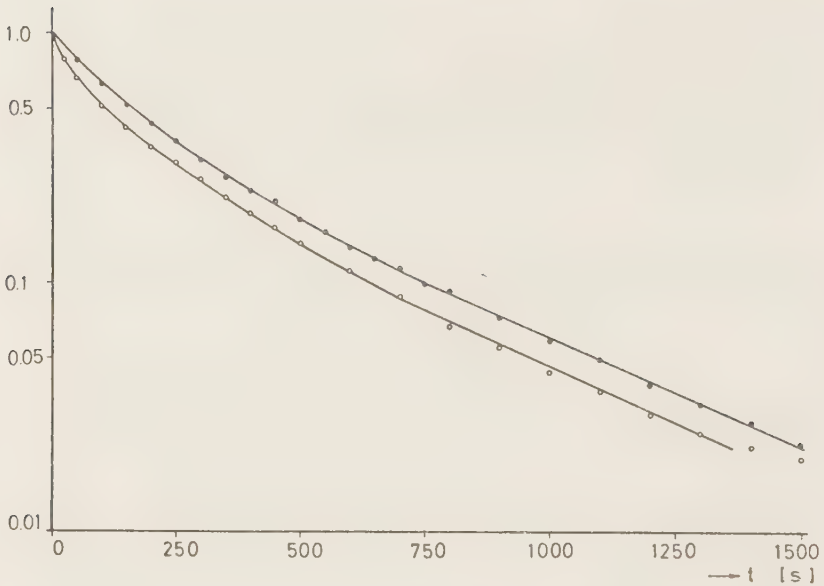


Abb. 16: Beispiel experimenteller Relaxationskurven

CB2-Konzentration: $c = 7,85 \text{ mMol/l}$

obere Kurve: Temperatursprung von 15 nach 18°C

untere Kurve: Temperatursprung von 21 nach 18°C

gen (S. 89) bedingt ist. Die abgelesenen Zeiten betragen zwischen 25 und 20000 sec. Entsprechend den theoretischen Ergebnissen von Kap. V.C.2 (Tab. 1, S. 63) nimmt der Unterschied zwischen τ^* und τ_{N-1} mit wachsendem $\bar{\theta}$ zu.

Die Auftragung von $\log \tau^* c^2$ gegen den Umwandlungsgrad $\bar{\theta}$ läßt einen Vergleich mit den Ergebnissen von Kap. V zu: durch Subtraktion von den theoretischen Kurven $\log \tau^* k_n c^2 / \bar{\theta}$ kann man $\log k_n$ bestimmen, da die theoretischen Berechnungen unterhalb $\bar{\theta} = 0,6$ nur eine minimale Variation mit σc^2 zeigen. Diese Differenz $\log k_n$ kann bei bekannter, festgehaltener Konzentration für verschiedene Umwandlungsgrade bestimmt werden, denen unterschiedliche Temperaturen zugrunde liegen. Aus der so

gefundenen Temperaturabhängigkeit von $\log k_n$ läßt sich nach der Arrhenius-Beziehung

$$\log k_n = \text{Const.} - \frac{AE}{2,3 \cdot RT} \quad (\text{VII.10})$$

die zur Keimbildung erforderliche Aktivierungsenergie AE berechnen.

Zur Bestimmung von $\log k_n$ als Funktion der Temperatur kann man auch die Verschiebung der Umwandlungskurven mit der Konzentration ausnutzen, indem man die Differenz $\log \tau_{k_n c^2}^* - \log \tau_{c^2}^*$ bei festem Umwandlungsgrad $\bar{\Theta}$ für verschiedene Konzentrationen bildet.

Obwohl aus physikalischen Gründen der mehrstufige Stern zur Beschreibung der Thermodynamik zu bevorzugen wäre, da ein schrittweises Schließen der Bindungen zur Tripelhelix erwartet werden muß, wurden alle Auswertungen mit dem AON-Stern durchgeführt: sämtliche Kinetikmodelle setzen einen einzigen Reaktionsschritt zwischen Knäuel und Helix voraus, und der Umwandlungsgrad geht über $\bar{\Theta}$ unmittelbar in die mittlere Relaxationszeit ein ((V.22), S. 55). Ein Beispiel für gemessene $\tau_{c^2}^*$ -Werte von Auf- und Abwärtssprüngen bringt Abb. 17 (S. 102):

Der Vergleich der Meßergebnisse mit den idealen theoretischen $\tau_{k_n c^2}^*$ -Werten zwischen $\bar{\Theta}=0,2$ (meßtechnisch bedingte Grenze) und $\bar{\Theta}=0,6$ (s. S. 100) ergab starke Diskrepanzen zwischen Auf- und Abwärtssprüngen, die bei Verwendung der Kurven für $|\delta \ln s|=0,05$ wesentlich geringer waren. Auf eine völlige Beseitigung der Unterschiede durch exakte Berechnung der relativen Sprunghöhe wurde verzichtet, da die Mittelwerte zwischen beiden Datengruppen hiervon nicht mehr berührt worden wären.

Tabelle 5 gibt einen Überblick über die k_n^- und AE-Werte, wie sie durch den Vergleich der Anfangssteigung

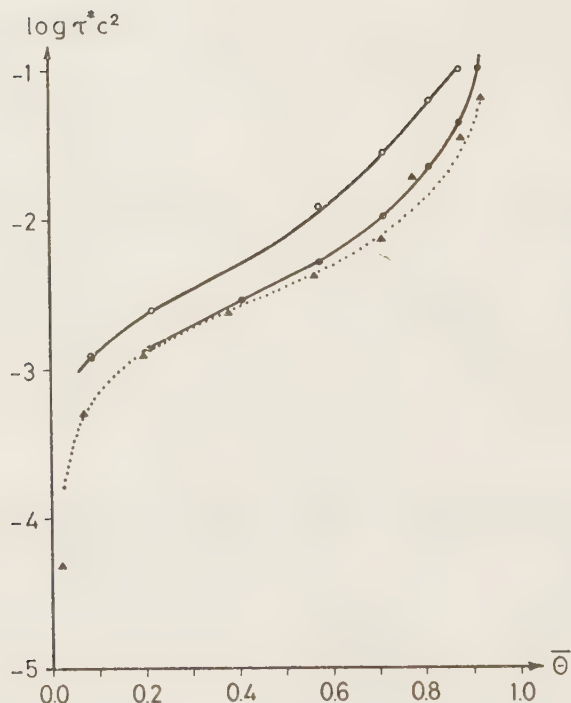


Abb. 17: Auftragung experimenteller Resultate von $\log \tau^* c^2$ gegen $\bar{\Theta}$ ($\tau^* c^2$ in $\text{sec.l}^2/(\text{Mol CB2})^2$)

durchgezogene Kurven und Kreise: $c=7,85 \text{ mMol/l}$
(offene Symbole: Abwärtssprünge bzgl. $\bar{\Theta}$)

Zum Vergleich wurden auch die Daten aus den Aufwärtssprüngen mit $c=3,46 \text{ mMol/l}$ eingetragen: $\blacktriangle$ und

der gemessenen Relaxationskurven mit den Ergebnissen der einzelnen Reaktionsmodelle gefunden wurden. Die Unterschiede in den k_n -Werten kommen durch die verschiedenen Lagen der theoretischen $\tau^* k_n c^2$ -Kurven zustande (Abb. 12, S. 71). Sie zeigen an, daß die Reaktion bei gleicher Keimbildungsgeschwindigkeit k_n umso schneller abläuft, je höher die Anzahl der Realisierungsmöglichkeiten für den Helixaufbau ist (g_r im einfachen Steady-State-Stern

	$\log k_n$ (bei 18°C) (l ² /Mol ² .sec)	AE (kcal/Mol CB2)
einstufiger AON-Stern	0,9 ± 0,1	-17 ± 4
einfacher Steady-State- Stern	0,8 ± 0,08	-14 ± 3
allgemeiner Steady-State- Stern	0,0 ± 0,05	-13 ± 3

Tab. 5: Keimbildungsgeschwindigkeit k_n und Aktivierungsenergie AE für CB2 bei Voraussetzung verschiedener Modelle.

und zusätzlich Keimbildung an jeder beliebigen Stelle im allgemeinen Steady-State-Stern).

Die Ergebnisse der zweiten Spalte stehen im Mittelpunkt von Abschnitt D. Sie zeigen, daß der Keimbildung ein schnelles Gleichgewicht mit hohem Enthalpiegewinn vorgelagert sein muß (Kap. IV.B.1.a, S. 29f).

Alle bisher beschriebenen Auswertungen der Relaxationsmessungen zeigen nicht, daß die Tripelhelix-Knäuel-Umwandlung wesentlich besser durch das Sternschema als durch das einfache AON-Modell beschrieben wird. Der wesentliche Unterschied zwischen beiden Modellen liegt im Auftreten weiterer Relaxationszeiten beim Sternmodell, welche die komplexe Relaxationskurve (Abb. 16) erklären können. Obwohl im Sternschema nur wenige, kaum von der maximalen Helixlänge unterscheidbare Spezies auftreten, zeigt bereits Tab. 1 (S. 63) durch die Verschiebung zwischen τ^* und τ_{N-1} an, daß die Relaxationskurven vor allem bei hohen Umwandlungsgraden stark gekrümmt sind. Bei

vorsichtiger Interpretation der Abschätzung (V.42) für die Gewichte β_r trägt τ_{M-1} für Umwandlungsgrade unter 0,2 ein Gewicht von mindestens 0,6; dieses fällt mit wachsendem Umwandlungsgrad, sollte bei $\Theta=0,5$ aber noch immer deutlich über 0,2 betragen (nach (V.42) zwischen 0,35 und 0,45 je nach Modell): die langsamste Relaxationszeit müßte auch mit Relaxationsmessungen nachweisbar sein. Die oben beschriebenen Berechnungen von k_n und AE wurden deshalb auch auf den Vergleich der experimentellen $\tau_{M,r}$ Werte mit den theoretischen Relaxationszeiten τ_{M-1} ausgedehnt, obwohl $\tau_{M,r}$ nur schwer aus den Meßkurven ablesbar war. Daraus resultierte eine im Vergleich zu Tab. 5 wesentlich höhere Fehlerbreite sowohl für $\log k_n$ als auch für die Aktivierungsenergie. Während der Mittelwert der k_n -Werte bei 18°C ungefähr mit jenen der Tabelle übereinstimmte, wurde die Aktivierungsenergie etwa dreimal so hoch bestimmt: -35 bis -40 kcal/Mol CB2. Demnach wurde hier bei tiefen Temperaturen eine zu hohe Reaktionsgeschwindigkeit k_n gemessen, die Schlußsteigung der gemessenen Relaxationskurven ist bei gleichem Reaktionsbeginn also größer, als nach den Sternmodellen zu erwarten wäre.

VII. D. Diskussion der Resultate

Das komplexe Relaxationsverhalten zeigt eindeutig, daß die Tripelhelix-Knäuel-Umwandlung aus mehr als zwei gekoppelten Reaktionen bestehen muß. Unter der Annahme eines Steady-State-Aufbaus der Helix nach dem "Reißverschlußprinzip" genügen thermodynamisches und kinetisches Verhalten von CB2 den auf Renaturierungsmessungen am Kollagen basierenden Vorstellungen ^{2,3)}, nach denen die Tripelhelix auch bei relativer Versetzung der Einzelstränge entstehen kann. Bei den langen Ketten des Kolla-

gens resultiert daraus die Möglichkeit zur Aggregation durch Anlagerung anderer Ketten an den über die Helix-region hinausreichenden Kettenstücken (eine Kette kann also Tripelhelices mit verschiedenen Partnern aufbauen). Tripelhelices der kurzen CB2-Ketten sind den Berechnungen von Kap. V zufolge nur stabil, wenn fast alle möglichen Wasserstoffbrücken geschlossen werden; die in diesem Fall ungebunden bleibenden Kettenenden sind für den Aufbau einer weiteren Helix zu kurz.

Die Kopplung mehrerer Reaktionen im Sternschema führt zum Auftreten zahlreicher Relaxationszeiten, die Relaxationskurven $\log_{10}$ über t werden in Übereinstimmung zum experimentellen Befund stark gekrümmt. Da alle Einzelreaktionen des Modells von dritter Ordnung sind, gilt dies auch für die Gesamtreaktion. Die am CB2 gefundene Reaktionsordnung ist in der Tat sehr nahe an drei. Nach Kap. IV muß daraus geschlossen werden, daß eine eventuell auftretende Dimeren-Zwischenstufe nur in verschwindender Gleichgewichtskonzentration vorliegen kann und daß dann der geschwindigkeitsbestimmende Schritt erst nach der Bildung dieses Zwischenprodukts auftritt.

Geht man davon aus, daß bei kurzen Ketten die Geschwindigkeit des Helixaufbaus im wesentlichen durch die Nukleation bestimmt wird (sie enthält den statistisch unwahrscheinlichsten Schritt der Reaktionskette als vorgelagertes Gleichgewicht), so läßt sich aus den Relaxationsmessungen die zum Aufbau des Keimes erforderliche Aktivierungsenergie bestimmen. Unter der Annahme des allgemeinsten Kinetikmodells ("allgemeiner Steady-State-Stern", dem zufolge der Helixkeim an jeder Stelle der Ketten mit gleicher Wahrscheinlichkeit entstehen kann) wurde eine Aktivierungsenergie von -13 ± 3 kcal/Mol CB2 ermittelt. Das negative Vorzeichen zeigt, daß die Nukleation kein Elementarschritt sein kann, für den nur posi-

tive Werte möglich sind. Negative Aktivierungsenergien sind nach S. 29f durch ein schnelles Gleichgewicht erklärbar, welches der den Keim aufbauenden Reaktionsstufe vorgelagert ist und dessen negative Reaktionsenthalpie die Aktivierungsenergie des folgenden langsamen Schritts überwiegt. Setzt man diese Aktivierungsenergie gleich Null, so folgt, daß die Enthalpie des vorgelagerten Gleichgewichts mindestens -13 kcal/Mol betragen muß, was dem Enthalpieumsatz von etwa fünf Propagationsschritten entspricht.

Liegt das Vergleichgewicht ganz auf der Seite der Coil-Form, so wird nach Kap. IV der erste langsame Schritt auch dann für die Gesamtreaktion geschwindigkeitsbestimmend, wenn er selbst nicht langsamer ist als die Einzelschritte der folgenden Reaktionskette. Nach der in Kap. VI entwickelten Vorstellung von der Nukleation ist dieser Fall bei der Tripelhelix-Coil-Umwandlung von Peptidketten realisiert: die Bildung einer sehr instabilen dimeren Zwischenstufe sollte ebenso diffusionskontrolliert erfolgen wie das Zustandekommen einer Berührung zwischen drei Ketten. Noch die ersten drei Wasserstoffbrücken zwischen den Ketten schränken die Bewegungsfreiheiten der einzelnen Tripeptidsegmente weniger ein, als dies bei den Propagationsschritten geschieht: die starre Fixierung eines ganzen Segments erfordert die Schließung zweier paralleler Wasserstoffbrücken im Abstand von drei Aminosäuren. Da die Helixstruktur erst durch mindestens ein helicales Segment in jeder Kette fixiert ist, wird diese Konfiguration als Keim betrachtet. Sein Aufbau verlangt demnach das Schließen von 6 Wasserstoffbrücken, von denen zumindest die letzte in einem der Propagation sehr ähnlichen Schritt gebildet werden sollte. Die Annahme eines größeren Keimes erscheint in diesem Bild als nicht gerechtfertigt.

Betrachtet man die sterische Fixierung der ersten beiden Segmente als noch zum Vergleichsgewicht gehörend, so kann ein Anteil von $-5,6$ kcal/Mol (Enthalpieumsatz zweier Propagationsschritte) an der Aktivierungsenergie erklärt werden. Einen höheren Wert erhält man unter der Annahme, daß die mit dem Propagationsschritt s verbundene Enthalpie im wesentlichen in Zusammenhang mit der Bildung der Wasserstoffbrücke steht und daß andere Enthalpiebeiträge dagegen vernachlässigbar sind: für das vorgelagerte Gleichgewicht ist dann $\Delta H_d = 5 \cdot (-2,8)$ kcal/Mol $= -14$ kcal/Mol, womit selbst bei Berücksichtigung einer positiven Aktivierungsenergie für den letzten den Keim aufbauenden Schritt der hohe negative Wert von -13 kcal/Mol erklärt werden könnte. In diesem Fall muß der Nukleationskonstanten ein Enthalpieanteil ΔH_d zugesprochen werden, da sonst die der Fixierung von drei Segmenten entsprechende Gleichgewichtskonstante ϕs^3 nicht aufrecht erhalten werden könnte. Bei dem in Abschnitt C.1.b erläuterten Verfahren zur Anpassung der Parameter werden sämtliche Enthalpieterme wegen der aus ihnen resultierenden Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten zu den Propagationsschritten gezählt, so daß ΔH_s des Einzelschrittes in diesem Fall um etwa $\Delta H_d/35$ zu hoch berechnet wurde.

Die Deutung des vorgelagerten Gleichgewichts durch eine Vorstruktur des dimeren Begegnungskomplexes scheidet aus. Zur Festlegung einer jeden Wasserstoffbrücke nach der ersten müssen zwei Tripeptide fixiert werden. Die Gleichgewichtskonstante dieser Struktur ist daher zu ungünstig, als daß die Weiterreaktion selbst bei schneller Einstellung dieses Gleichgewichts mit vernünftiger Geschwindigkeit erfolgen könnte: für den Fall von 5 Wasserstoffbrücken ohne Berücksichtigung einer Kooperativität für die Bildung der "Doppelhelix" ist die Gleichgewichtskonstante gegeben durch $\exp \frac{1}{RT} \{ -5\Delta H_s + 8T\Delta S_0 \} = e^{-14,5} \approx 5 \cdot 10^{-7}$.

Rechnet man das Vergleichsgewicht des trimeren Berührungskomplexes (VI.6) hinzu, so müßte der erste langsame Schritt nach (IV.25a) eine Geschwindigkeitskonstante von 10^{10} sec^{-1} besitzen, um $k_n \approx 1 \text{ l}^2/\text{Mol}^2 \text{ sec}^{-1}$ zu erzielen. Dieser Schritt wäre aber um 6 Größenordnungen schneller als jeder Propagationsschritt ($k = k_n / \sigma s^2$)!

Privalov und Tiktopulo ¹³⁾ sowie Cooper ¹⁴⁾ vermuten einen mit wachsendem Iminosäuregehalt des Peptids zunehmenden Einfluß des Lösungsmittels auf die Tripelhelixbildung. Wegen der partiellen Fixierung auch der nicht unmittelbar den Keim aufbauenden Segmente könnte dadurch ein über den Anteil von $2\Delta H_s$ hinausreichender Beitrag zur Aktivierungsenergie erklärt werden, doch lassen die Autoren die Art der Wechselwirkung offen.

Schließlich sei erwähnt, daß die hohe negative Aktivierungsenergie auch die Folge der Steady-State-Annahme sein könnte, obwohl diese Gefahr nur gering geschätzt wird. Zwar gilt diese Annahme nicht zur Zeit des Reaktionsbeginns (Messung von τ^*), doch setzt nach Elson ^{58,59)} die Phase der Stationarität umso eher ein, je höher die Kooperativität und je geringer der Umwandlungsgrad sind. Die Auswertung der Messungen erfolgte im Bereich von $\sigma c^2 \approx 10^{-8}$ für $\theta \leq 0,6$.

Auch ein systematischer Meßfehler ist nicht auszuschließen. Ein Vergleich der Relaxationszeiten τ_{n-1} und τ_3 (Tab. 1, S. 63: 4 Größenordnungen Unterschied) mit den für τ_{Max} gemessenen Werten (bis herab zu 25 sec) zeigt sofort, daß das Meßgerät nicht alle Relaxationszeiten auflösen konnte. Die Abschätzung (V.42) für β_r gestattet im Bereich kleiner Umwandlungsgrade zwar die Vernachlässigung fast aller kürzeren Relaxationszeiten, doch wäre eine Kontrolle mit Hilfe schneller T-Sprünge ($\approx 100 \text{ msec}$) günstig. Da die üblichen Geräte wegen des

Fehlens von Absorptions- oder Fluoreszenzsignalen nicht verwendbar sind, müßte dafür ein bisher nicht erhältliches schnell registrierendes Polarimeter verwendet werden.

VIII. ZUSAMMENFASSUNG

Für die theoretische Beschreibung von Thermodynamik und Kinetik der kooperativen Umwandlung zwischen tripelhelicaler und statistisch verknäuelter Struktur wurden alle Möglichkeiten berücksichtigt, nach denen sich die drei Molekülketten in relativer Versetzung zueinander zur Tripelhelix zusammenfinden können. Die Rechnungen wurden ergänzt durch Messungen an dem 36 Aminosäuren langen Fragment "CB2" aus der $\alpha 1$ -Kette von Kollagen.

Für kurze Ketten kann das Gleichgewicht zwischen jeder Helix-Spezies und der Knäuelform durch das "Alles-Oder-Nichts"-Modell beschrieben werden. Die Kopplung dieser Systeme führt zur Verbreiterung der Umwandlungskurven, welche bereits deutlich unter der Sättigung ein scheinbares Plateau erreichen, obwohl Trimere mit geringer Helixlänge sehr instabil sind. Die Kooperativität der Umwandlung hängt wegen der Beteiligung dreier Monomere vom Quadrat der Konzentration ab.

Dem Aufbau aus Alles-Oder-Nichts-Gleichgewichten entsprechend wurde das kinetische Verhalten aus einem System gekoppelter Steady-State-Reaktionen berechnet, deren Geschwindigkeit durch die Bildung eines tripelhelicalen Keimes in einer Reaktion dritter Ordnung bestimmt wird. Das Relaxationsspektrum ist eng mit der Population an einzelnen Helixspezies verknüpft, die mittlere Relaxationszeit steigt mit wachsendem Umwandlungsgrad wegen der Stabilität der konkurrierenden Spezies stark an. Wie die Thermodynamik, so wird auch die Kinetik des Systems umso besser durch den Alles-Oder-Nichts-Mechanismus beschrieben, je höher die Kooperativität und je geringer die Kettenlänge sind.

Unter Vernachlässigung sämtlicher Kräfte zwischen den Peptidketten oder zwischen Peptid und Lösungsmittel

konnte die thermodynamische Erschwerung der Keimbildung abgeschätzt werden: der theoretisch berechnete Nukleationsparameter $\sigma = 5 \cdot 10^{-5} \text{ l}^2/\text{Mol}^2$ setzt sich zusammen aus einem Anteil $\sigma_{tr} = 6,5 \cdot 10^{-4} \text{ l}^2/\text{Mol}^2$, mit dem die Begegnungswahrscheinlichkeit der Monomeren in der Lösung beschrieben wird, sowie dem durch die gegenseitige sterische Behinderung gegebenen Faktor $d_{st} \approx 8 \cdot 10^{-2}$, der sich etwas mit der Kettenlänge und dem chemischen Aufbau der Peptidmoleküle ändert.

Das thermodynamische und kinetische Verhalten von CB2 wurde anhand der Änderung der optischen Aktivität untersucht und mit den theoretischen Ergebnissen verglichen. Dabei ergab sich:

1) Ohne Kenntnis der molekularen Daten (Nukleationsparameter σ , Enthalpie ΔH_s und Entropie ΔS_0 des Propagationsschrittes, optische Drehung $[\alpha]^\lambda$ bei maximaler Helixlänge) läßt die Form der Umwandlungskurven keine Entscheidung zwischen dem Alles-Oder-Nichts-Verhalten und den beiden Varianten des "staggering-zipper-Modells" zu.

2) Zur Bestimmung von σ und ΔS_0 ist die Auswertung für verschiedene Kettenlängen erforderlich. σ wurde daher aus Umwandlungsdaten der Literatur für $(\text{Gly-Pro-Pro})_N$ mit $N=10, 15$ und 20 nach den einzelnen Modellen berechnet und für CB2 übernommen. Die mit Hilfe der beiden staggering-zipper-Modelle ermittelten Parameter sind:
 $5 \cdot 10^{-4} \text{ l}^2/\text{Mol}^2 \geq \sigma \geq 10^{-5} \text{ l}^2/\text{Mol}^2$;
 $\Delta H_s = -2,75 \pm 0,15 \text{ kcal/Mol Bindungen}$;
 $\Delta S_0 = -8,4 \pm 0,4 \text{ Clausius/Mol Bindungen}$.

3) Die Reaktionsordnung von CB2 ist $2,9 \pm 0,2$. Die Relaxationskurven zeigen die Existenz mehrerer gekoppelter Reaktionen. Aus dem Vergleich der mittleren Relaxationszeiten ($20 \text{ sec} \leq \tau^* \leq 4500 \text{ sec}$) mit den theoretisch berechneten Werten erhält man für die Geschwindigkeits-

konstante der Keimbildung je nach dem verwendeten Modell Werte zwischen 1 und $10 \text{ l}^2/\text{Mol}^2\text{sec}$ (bei 18°C). Die Aktivierungsenergie liegt für diesen Schritt zwischen -12 und -15 kcal/Mol CB2. Ihr hoher negativer Wert zeigt, daß die Keimbildung über ein schnelles Vorgleichgewicht erfolgen muß. Hinweise auf die Art dieser Zwischenstufe lassen sich vielleicht durch Messungen an synthetischen Polytripeptiden wie $(\text{Gly-Pro-Pro})_N$ gewinnen, wo die intermolekularen Wechselwirkungen unabhängig vom Segment und daher leichter zu überschauen sein sollten.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) E. Ising, Z.Physik 31, 253 (1925)
- 2) G. Beier, Dissertation, Universität München (1966)
- 3) W.F. Harrington, N.V. Rao, Biochem. 2, 3174 (1970)
- 4) S. Igarashi, A.H. Kang, J. Gross, Biochem.Biophys.Res.Comm. 38, 697 (1970)
- 5) J. Vuust, J.M. Lane, P.P. Fietzek, E.J. Miller, K.A. Piez, Biochem.Biophys.Res.Comm. 38, 703 (1970)
- 6) K.A. Piez, M. Rubin Sherman, Biochem. 2, 4129 (1970)
- 7) K.A. Piez, M. Rubin Sherman, Biochem. 2, 4134 (1970)
- 8) J. Engel, in "Conformation of Biopolymers" Bd. 2, S. 483 (Hrgb.: G.N. Ramachandran, Acad.Press, 1967)
- 9) J. Engel, J. Kurtz, E. Katchalski, A. Berger, J.Mol.Biol. 17, 255 (1966)
- 10) A. Yonath, W. Traub, J.Mol.Biol. 43, 461 (1969)
- 11) Y. Kobayashi, R. Sakai, K. Kakiuchi, T. Isemura, Biopol. 2, 415 (1970)
- 12) J. Rauterberg, K. Kühn, Europ.J.Biochem. 19, 398 (1971)
- 13) P.L. Privalov, E.J. Tiktopulo, Biopol. 2, 127 (1970)
- 14) A. Cooper, J.Mol.Biol. 55, 123 (1971)
- 15) G.N. Ramachandran, G. Kartha, Nature 176, 593 (1955)
- 16) A. Rich, F.H.C. Crick, J.Mol.Biol. 3, 483 (1961)
- 17) G.N. Ramachandran, C.M. Venkatachalam, Biochim.Biophys.Acta, 120, 457 (1966)
- 18) G.N. Ramachandran, V. Sasisekharan, in "Advances in Protein Chemistry", Bd. 23, S. 283 (Hrgb.: C.B.Anfinsen jr., M.L.Anson, J.T. Edsall, F.M.Richards, Acad.Press, N.Y.,London, 1968)

- 19) G.N. Ramachandran, R. Chandrasekharan,
Biopol. 6, 1649 (1968)
- 20) G.N. Ramachandran, B.B. Doyle, E.R. Blout,
Biopol. 6, 1771 (1968)
- 21) N.V. Rao, W.F. Harrington,
J.Mol.Biol. 21, 577 (1966)
- 22) Sh. Sakakibara, K. Inouye, K. Shudo, Y. Kishida,
Y. Kobayashi, D.J. Prockop,
Biochim.Biophys.Acta 303, 198 (1973)
- 23) R.A. Berg, B.R. Olsen, D.J. Prockop,
J.Biol.Chem. 245, 5759 (1970)
- 24) B.H. Zimm, J.K. Bragg, J.Chem.Phys. 31, 526 (1959)
- 25) S. Lifson, A. Roig, J.Chem.Phys. 34, 1963 (1961)
- 26) G. Schwarz, Habilitationsschrift,
Techn. Hochsch. Braunschweig (1966)
- 27) G. Schwarz, Biopol. 6, 873 (1968)
- 28) G.R. Wannier, Rev.Mod.Phys. 17, 50 (1945)
- 29) J. Applequist, J.Chem.Phys. 38, 934 (1963)
- 30) D. Winklmair, Dissertation,
Techn. Hochsch. München (1969)
- 31) V. Ganser, J. Engel, D. Winklmair,
Biopol. 2, 329 (1970)
- 32) D. Winklmair, J. Engel, V. Ganser,
Biopol. 10, 721 (1971)
- 33) J. Applequist, Biopol. 6, 117 (1968)
- 34) S. Lifson, J.Chem.Phys. 40, 3705 (1964)
- 35) H. Jacobson, W.H. Stockmayer,
J.Chem.Phys. 18, 1600 (1950)
- 36) F.T. Wall, L.A. Hiller, D.J. Wheeler, W.F. Atchison,
J.Chem.Phys. 22, 1036 (1954) sowie
23, 913 und 2314 (1955)
- 37) B.H. Zimm, J.Chem.Phys. 33, 1349 (1960)

- 38) B. Goldstein, Ch. DeLisi, J.Chem.Phys. 51, 431 (1969)
- 39) M. Kumbar, J.Chem.Phys. 53, 1036 (1970)
- 40) M. Kumbar, J.Chem.Phys. 55, 2079 (1971)
- 41) J. Applequist, V. Damle, J.Chem.Phys. 39, 2719 (1963)
- 42) J. Applequist, V. Damle,
J.Am.Chem.Soc. 87, 1450 (1965)
- 43) D. Pörschke, Diplomarbeit, Uni. Göttingen (1966)
- 44) D. Pörschke, Dissertation,
Techn. Uni. Braunschweig (1968)
- 45) M. Eigen, D. Pörschke, J.Mol.Biol. 53, 123 (1970)
- 46) M. Eigen, L. De Maeyer, in "Technique of Organic
Chemistry", Bd. 8/2, S. 890 (1963)
(Hrgeb.: A.Weissberger, Interscience, N.Y., London)
- 47) G. Schwarz, J.Mol.Biol. 11, 64 (1965)
- 48) M.E. Craig, D.M. Crothers, Biopol. 6, 385
- 49) D.A. McQuarrie, J.P. McTague, H. Reiss,
Biopol. 3, 657 (1965)
- 50) N. Go, J.Phys.Soc.Jap. 22, 416 (1967)
- 51) A. Silberberg, R. Simha, Biopol. 6, 479 (1968)
- 52) G. Schwarz, Ber.Bunsenges. 75, 40 (1971)
- 53) G. Schwarz, J.Theor.Biol. 36, 569 (1972)
- 54) A. Silberberg, R. Simha, Macromol. 5, 332 (1972)
- 55) P.K. Rawlings, F.W. Schneider,
Ber. Bunsenges. 77, 237 (1973)
- 56) D. Pörschke, M. Eigen, J.Mol.Biol. 62, 361 (1971)
- 57) M.E. Craig, D.M. Crothers, P. Doty,
J.Mol.Biol. 62, 383 (1971)
- 58) E.L. Elson, J.Mol.Biol. 63, 469 (1972)
- 59) E.L. Elson, Biopol. 11, 1499 (1972)

- 60) A. Ikai, Ch. Tanford, Nature 230, 100 (1971)
- 61) E. Neumann, Th. Ackermann,
J.Phys.Chem. 71, 2377 (1967)
- 62) Th. Ackermann, in "Biochem. Microcalorimetry" S. 121
(Acad.Press, 1969)
- 63) F. Neiss, "Determinanten und Matrizen", 6. Aufl.
(Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1962)
- 64) P.J.Flory, "Statistical Mechanics of Chain Molecules"
(Interscience, N.Y. 1969)
- 65) J.T. Edsall, P.J. Flory, J.C. Kendrew, A.M. Liquori,
G. Némethy, G.N. Ramachandran,
J.Mol.Biol. 15, 399 (1965)
- 66) P. Bornstein, Biochem. 6, 3082 (1967)
- 67) F.M. Pohl, Europ.J.Biochem. 4, 373 (1968)
- 68) F.M. Pohl, pers. Mitteilung an J. Engel (1969)
- 69) N. Lupu-Lotan, A. Yaron, A. Berger, M. Sela,
Biopol. 3, 625 (1965)
- 70) C.H. Chervenka, "A Manual of Methods for the
Analytical Ultracentrifuge"
(Hrgb.: Beckman-Instruments, Stanford 1969)
- 71) G. Hänisch, Dissertation,
Techn. Uni. München, (1970)
- 72) D.L. Marquardt, J.Soc.Ind.Appl.Math. 2, 431 (1963)

Lebenslauf

Am 21. September 1944 wurde ich in Feldkirch (Österreich) geboren als Sohn des Facharztes Dr. Kurt Weidner und seiner Frau Sophie, geb. Oberländer.

Nach 4 Jahren an der Innstadt-Volksschule in Passau (Niederbayern) besuchte ich von 1954 bis 1959 das dortige naturwissenschaftliche Gymnasium, dann bis zur Reifeprüfung 1963 das Klenze-Gymnasium in München. Im Wintersemester 1963/64 begann ich mit dem Physikstudium an der Universität München, wo ich zwei Jahre später die Diplom-Vorprüfung bestand. Nach einem Semester in Göttingen kehrte ich im Winter 1966/67 an die Münchner Universität zurück, wo ich von 1967 bis 1969 unter Prof. Dr. H. Schober meine Diplomarbeit über "Interferometrische Ausmessung der Hornhautoberfläche" anfertigte. Die Diplom-Hauptprüfung in Physik legte ich im Sommer 1969 ab.

Im August 1969 begann ich am Münchner Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung mit der vorliegenden Arbeit, die ich am Biozentrum in Basel abschloß, wo ich 1972 mit einer Assistentenstelle betraut wurde.

